

# **DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Paramágneses heterociklusos nitroxidok és diamágneses származékaik szintézise és alkalmazása**

**Kálai Tamás**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet**

**Pécs  
2006**

## 1. Bevezetés

A Pécsi Tudományegyetem Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében (korábban POTE, Központi Kutató Laboratórium, Kémia) csaknem ötven éve végeznek tudományos kutatómunkát a heterociklusos vegyületek területén, különös tekintettel a várhatóan biológiailag aktív vegyületek szintézisére. Az 1970-es évek közepétől az intézetben – Magyarországon egyedülállóan – kezdtek foglalkozni az intézet munkatársai (Dr. Hideg Kálmán, Dr. H. Hankovszky Olga) a paramágneses pirrolin, pirrolidin és piperidin nitroxidok szintézisével. Eleinte ezekkel a vegyületekkel a helyi biofizikai kutatások igényeit elégítették ki, majd a nemzetközi kapcsolatok kiszélesedésével, az újabb és újabb alkalmazási területek megjelenésével az előállított vegyületek száma és változatossága is növekedett. Intézetünk akkori munkatársai szervezték az első „Szabad Gyökös Kongresszust” Pécsen 1979-ben. A csoport munkájába 1992-ben MTA-TMB ösztöndíjasként kapcsolódtam be és 1997-ben védtem meg kandidátusi disszertációmát „Új, allil-típusú nitroxidok szintézise és alkalmazása” címmel. Jelen értekezésemben a kandidátusi fokozat megszerzése óta eltelt időszakban a pirrolin nitroxidokhoz kapcsolt karbo- és heterociklusok, új polifunkciós spinjelző vegyületek, kettősen (spin és fluoreszcens) jelölő vegyületek, illetve új, biológiailag aktív vegyületek szintézise területén végzett eredményeimet foglalom össze.

Az elmúlt két évtizedben sorra jelentek meg olyan közlemények, amelyek a nitroxidok klasszikus alkalmazásán (spinjelölés) túl egyéb (pl. kooxidáns, kontrasztanyag, spinscapda, polimerkémiai segédanyag, szerves ferromágnes) alkalmazását is tárgyalják, de kimutatták azt is, hogy ezek a vegyületek, valamint amin prekursoraik antioxidáns hatással, szuperoxid diszmutáló és kataláz hatással is rendelkeznek. Ez utóbbi tény az magyarázza, hogy a paramágneses csoport az egy elektron átmenettel járó folyamatokba (mint amilyen az élőszervezetekben lejátszódó oxidációs-redukációs folyamatok nagy része) be tud kapcsolódni. Más kutatócsoportok ill. kutatócsoportunk megfigyelései alapján állíthatjuk, hogy a nitroxidokkal vagy diamágneses prekursoraikkal történő módosítás kedvezően befolyásolja a módosított alapmolekula aktivitását és hatásspektrumát. Ezek a megfigyelések megdönteni látszanak a stabilis szabad gyökös vegyületek toxikusságának korábbi dogmáját és talán a 2,2,5,5-tetrametil-pirrol(id)in, 2,2,6,6-tetrametil-piperidin gyűrűk ill. ezek oxidált származékainak farmakofor csoportként történő elfogadását, bevezetését eredményezik. Így érdekes és izgalmas kihívásnak mutatkozott az olyan biológiailag aktív vegyületek szintézise,

amelyekbe a pirrol(id)in gyűrűt a biológiai hatásért felelős szerkezeti elemek, funkciós csoportok megtartásával építettük be.

A nitroxidok spincsapdakénti alkalmazása szintén a szabad gyökös folyamatok iránti megnövekedett érdeklődésnek tulajdonítható. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) és reaktív nitrogénszármazékok (RNS) analitikájában olyan vegyületeket is alkalmaznak, ahol a nitroxidot egy fluorofor molekulához kapcsolják. Az eredmény a fluoreszcencia csökkenése vagy növekedése az alkalmazott rendszertől függően és a folyamat két független biofizikai módszerrel (ESR és fluoreszcencia) követhető. Ezért ezeket kettősen jelölő vegyületeknek ill. kettős indikátoroknak nevezzük. A Maryland-i Egyetemen (College Park, USA) eltöltött 1 éves tanulmányutam alatt volt alkalmam megismerkedni a kettősen jelölő vegyületek vizsgálatának technikai részleteivel is.

A célkitűzések megvalósításához nagyban hozzájárultak az intézet korábbi „klasszikus” heterociklusos kémiai (ftálimid származékok, benzazolok, benzazepinek) és a nitroxidokkal végzett munkáinak tapasztalatai. A jelenlegi és a közelmúltban végzett munkáink egy része ezt a két irányvonalat igyekszik ötvözni, reményeink szerint érdekes, új vegyületeket eredményezve.

A tudományos eredményeket - mivel az elérni kívánt cél ill. alkalmazás tekintetében különböznek - négy érdemi fejezetben mutatom be, bár a problémák szintetikus kémiai megközelítésében átfedések is előfordulnak. Ezt az is magyarázza, hogy a közlemények megírásakor olyan módszereket igyekeztünk kidolgozni, olyan kulcsvegyületeket előállítani, amelyek több célra is felhasználhatók voltak. A második fejezet az új, általánosan használható kulcsvegyületekről és a spinjelző vegyületekről ad áttekintést. A harmadik fejezet a karbociklusokhoz, heterociklusokhoz kondenzált és egy  $\sigma$ -kötésen keresztül kapcsolt nitroxidok szintéziséről szól. A negyedik fejezet az új, paramágnesesen módosított aminosavakat, egyszerű szénhidrátokat, gyógyszereket mutatja be. Az ötödik fejezetben a kettősen (spin és fluoreszcencia) jelölő anyagok szintézisét és vizsgálatát mutatom be. A 2-5 fejezetekeben néhány oldalas irodalmi áttekintés után következnek a saját eredmények. A hivatkozásokat kétféleképpen tüntettem fel: a felső indexben római (I-XXX) számmal jelölt hivatkozások az értekezés alapjául szolgáló, a „Függelékben” lévő közlemények sorszáma, míg az arab számmal feltüntetett hivatkozások a disszertáció anyagához kötődő saját vagy fontosabb idegen hivatkozások, melyeket az adott kérdéskör tárgyalásakor mindenképpen fel akartam tüntetni. Az értekezést az „Összefoglalás” és az „Irodalomjegyzék” fejezetek zárják.

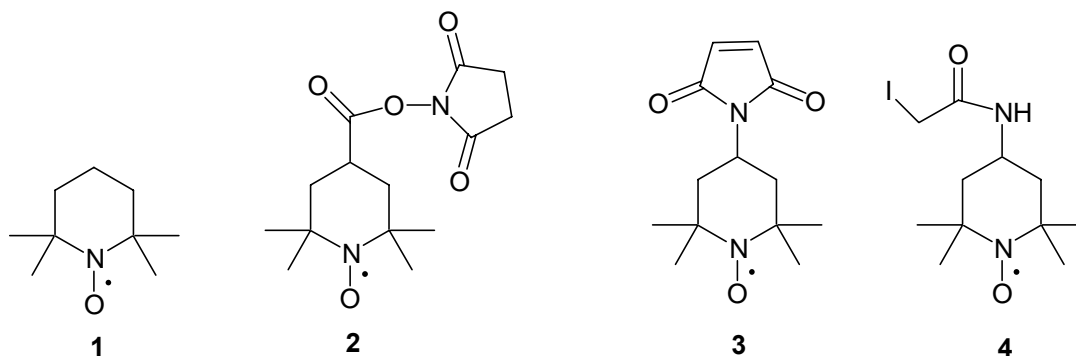
Az „Irodalomjegyzék” fejezetben két listát készítettem: a tézisek alapjául szolgáló listát római számokkal és az egyéb hivatkozások listáját arab számokkal láttam el.

Jelen értekezés 29 megjelent ill. megjelenés alatt lévő, angol nyelvű, bírált dolgozat és 1 szabadalom anyagának az összefoglalása. Ezeket a külön bekötött „Függelék” tartalmazza.

## 2. Kulcsintermedierek és spinjelző vegyületek szintézise

### 2.1. Irodalmi háttér

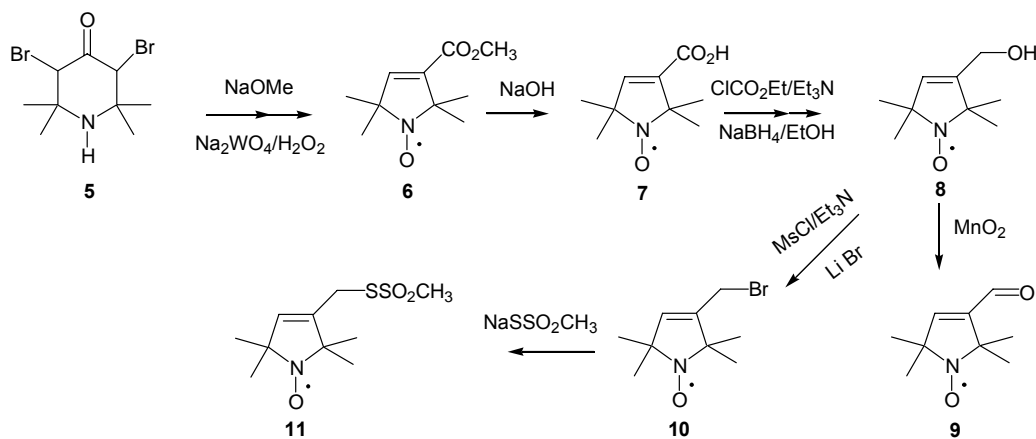
Az 1950-es évek végén, 60-as évek elején szovjet<sup>1</sup> és amerikai<sup>2</sup> kutatók fedezték fel, hogy a szterikusan gátolt aminvegyületek *N*-oxidjai stabilis szabad gyökök, amelyek ESR spektruma izotróp triplett jelet ad. Az 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidin (TEMPO, **1**) vegyületet először McConnell és Hubbell alkalmazták a 60-as évek közepén sejtmembránok biofizikai vizsgálatára.<sup>3</sup> Ez idő tájt Rassat és Rozantsev laboratóriumaiban olyan 2,2,6,6-tetrametil-piperidin, 2,2,5,5-tetrametil-pirrolidin és 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrol (pirrolin) nitroxidokat állítottak elő,<sup>4,5</sup> amelyeket a fehérjekémiában használatos reagáló funkciós csoportokkal<sup>6</sup> láttak el. Így bevezették pl. aminocsoport acilezésére a **2** aktív észtert ill. a cisztein tiolcsoportjának módosítására a **3** maleimid és a **4** jód-acetamid származékokat (1 ábra).



1. ábra: Piperidin nitroxidok szerkezete

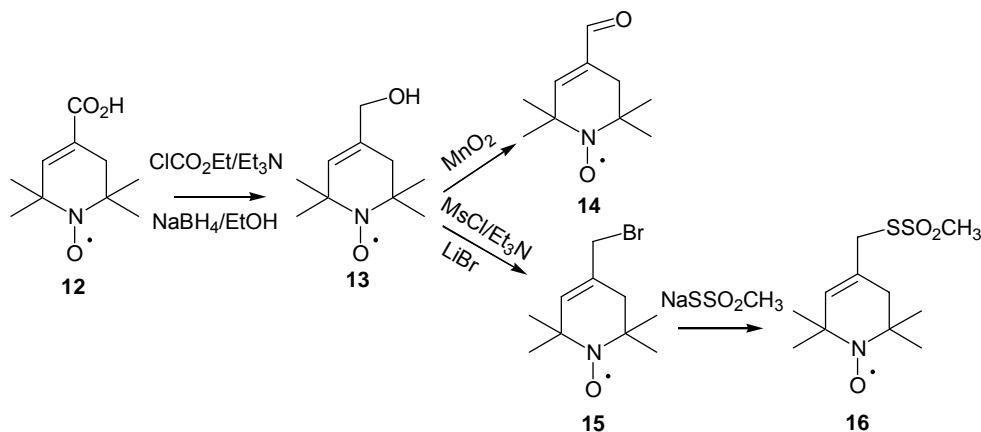
A **2-4** származékokat kovalens kötéssel egy fehérje molekulához kapcsolva az ESR spektrum izotróp triplett jele anizotróppá válik és az anizotróp spektrum mértékéből és a jel alakjából lehet információt szerezni a megjelölt molekula szerkezetéről, funkciójáról. Ezt nevezzük spinjelölésnek. A spinjelölés valójában négy lépésből áll: a spinjelző megtervezése és szintézise, a biomolekula kovalens módosítása a paramágneses jelölővel és tisztítása, az ESR spektrumok felvétele, az ESR spektrum kiértékelése és szimulációja. Az első lépés általában a szerves vegyész feladata, a következő három lépést már a biokémikusok és a biofizikusok végzik el. Ahogy azt a bevezetőben már említettem, intézetünkben Hideg professzor és munkatársai az 1970-es évek közepén kezdtek el foglalkozni a stabilis nitroxidvegyületek kémiájával. Az alap nitroxidvegyületek (**1-4**) előállításán túl érdeklődésük egyre inkább a pirrolin nitroxidok szintézise<sup>7-9</sup> és alkalmazása felé fordult, mert számos tapasztalat arra utalt, hogy ezek a vegyületek stabilisabbak, mint a hattagú piperidin nitroxidok. Ezt később részletes fiziko-kémiai vizsgálatok is alátámasztották.<sup>10</sup>

Az igazi áttörést ezen a területen a pirrolin nitroxidok szintézisének a kidolgozása jelentette, amivel néhány 10 ill. 100 grammos tételekben elő lehetett állítani a kiindulási anyagokat és a fontosabb intermediereket. A triacetonamin brómozott származékának (**5**) nátrium-metiláttal kiváltott Favorszkij-gyűrűszűküléses reakciója, majd azt követő hidrogén peroxidos,  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ -tal katalizált reakciója a **6** észtert szolgáltatta, amelyet hidrolizálva **7** karbonsavhoz jutottak, ezt aktív észteren keresztül **8** alkohollá alakították. A **8** alkoholt azután aktív  $\text{MnO}_2$ -dal **9** aldehiddé oxidálták, ill. az alkohol metánszulfonsav észterét  $\text{LiBr}$ -dal reagáltatva **10** paramágneses allil-brómhoz jutottak.<sup>8,9</sup> A **10** paramágneses brómvegyületből  $\text{NaSSO}_2\text{CH}_3$ -tal alakították ki a **11** (**HO-225**) reverzibilis, tiolspecifikus spinjelző metántioszulfonát reagenst, amelyet először a papain fehérje módosítására használtak (2. ábra).<sup>11</sup>



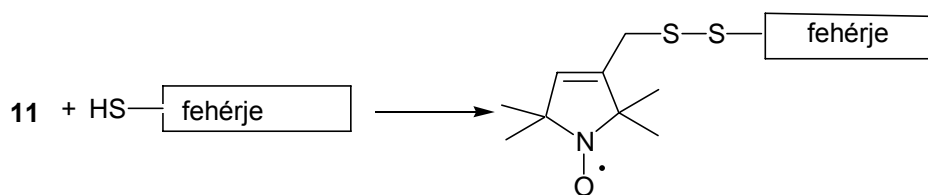
2. ábra: Pirrolin nitroxidok szintézise

Intézetünkben Csekő és munkatársai a 80-as évek közepén kidolgozták a megfelelő 1,2,3,6-tetrahidropiridin származékok szintézisét **12** karbonsavból<sup>12</sup> kiindulva, így a fentiekhez hasonló reakciókban **13** alkoholhoz, **14** aldehidhez, **15** brómvegyülethez és **16** metántioszulfonáthoz jutottak (3. ábra).<sup>13</sup>



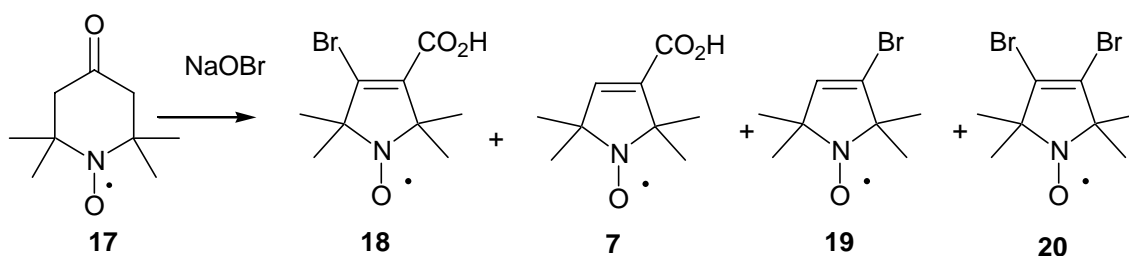
3. ábra: 1,2,3,6-Tetrahidropiridin nitroxidok szintézise

Az 1980-as években G. Khorana és munkatársai kidolgoztak egy eljárást az un. cisztein pontmutánsok szintézisére.<sup>14</sup> Ezzel a módszerrel egy adott peptidlánc tetszőleges helyére ciszteint lehet beépíteni, majd annak tiolcsoportját a **11** vegyülettel módosítani (4. ábra). Mivel a mutáns fehérjék általában csak kis mennyiségben állnak rendelkezésre, ezért nagyobb érzékenységű ESR készüléket kellett használni, ezt az un. loop-gap rezonátorok alkalmazásával valósították meg.<sup>15</sup> Mindezek a fejlesztések vezettek ahhoz, hogy W. L. Hubbell laboratóriuma a 90-es években bevezette a „site-directed spin labelling” (SDSL) technikát, amely az ESR spektroszkópia biofizikai alkalmazásának ma már egyik széles körben elterjedt módszere.<sup>16</sup>



4. ábra: SH-specifikus spinjelölés HO-225-tel.

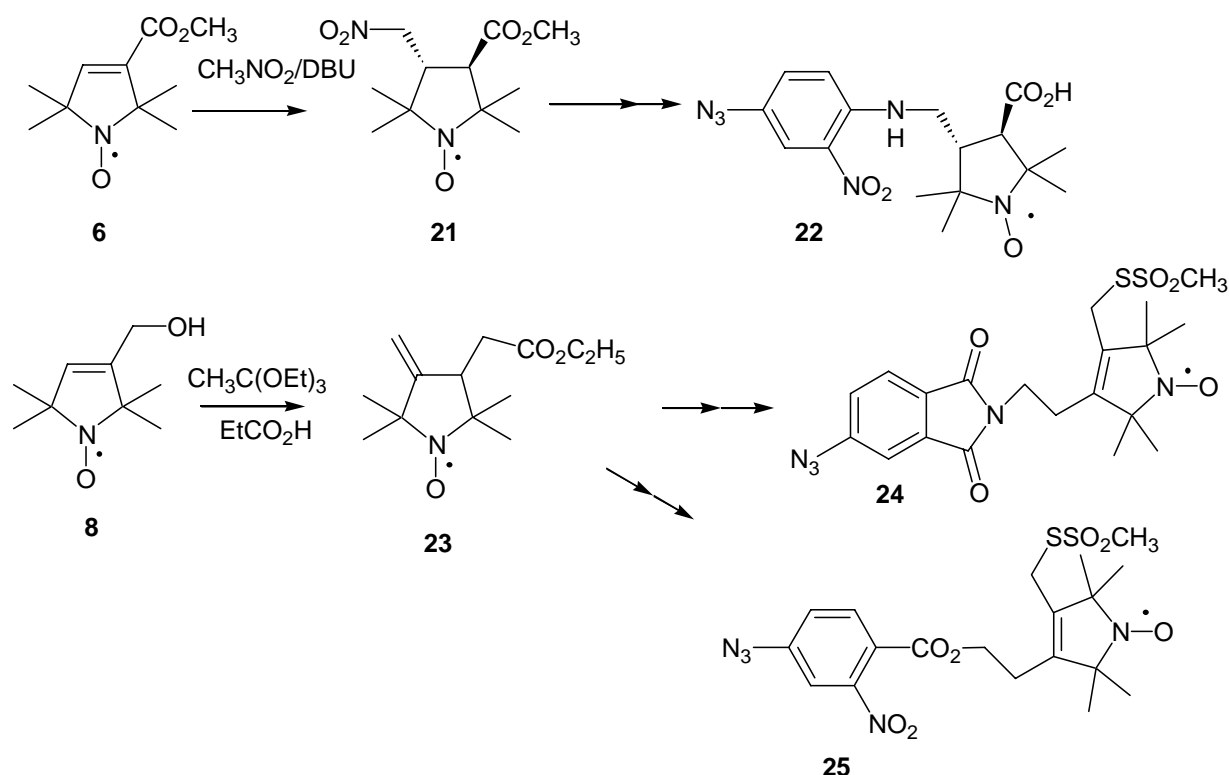
Az SDSL technika egyik lehetséges továbbfejlesztését az új metántioszulfonát spinjelzők tervezése jelentette. A biofizikusok részéről felmerült az igény, hogy a pirrolin nitroxidgyűrűre egy második, reagáló vagy nem reagáló csoportot kell beépíteni abból a célból, hogy a spinjelző sajátmozgását gátolják ill. lecsökkentsék. Ennek egyik lehetséges módszere, hogy a pirrolin ill. pirrolidin gyűrű 4-es helyzetébe egy újabb szubsztituenst építenek be. Példaként a 4-oxo-TEMPO (**17**) NaOBr-tal végzett Favorszki-gyűrűszűküléses reakcióját említhetjük, ennek terméke a **18** karbonsav, amely pirrolingyűrűjének 4-es szénatomjához egy brómatom kapcsolódik. Melléktermékként a **7** karbonsav és a **19**, **20** vinil-bromidok is keletkeznek (5. ábra).<sup>17</sup> A **18**, **19**, **20** vegyületek a **7** karbonsavhoz képest is számos új továbbalakítási lehetőséget kínálnak.



5. ábra : Paramágneses vinil-halogenidek előállítása

Intézetünkben a 80-as évek végén, 90-es évek elején több módszert dolgoztak ki a 3,4-diszubsztituált pirrolin nitroxidok szintézisére. Az egyik legjelentősebb a nitrometán **6**

észterre történő báziskatalizált konjugált addíciója volt, ami a **21** vegyületet eredményezte. Ebből több lépésen keresztül jutottak el a **22** heterobifunkcionális spinjelző vegyülethez.<sup>18</sup> A 3,4-diszubsztituált pirrolin ill. pirrolidin nitroxidok szintézisének másik lehetséges útját Sár és munkatársai dolgozták ki, a **8** paramágneses allil-alkoholból szigmatrop átrendeződési reakciókkal a 4-es helyzetben exociklusos kettős kötést tartalmazó észtert (**23**) kapták.<sup>19</sup> Ebből többlépéses reakción keresztül lehetett eljutni a **24** ill. **25** tiolspecifikus és fotoaktiválható keresztkötő spinjelző vegyületek szintéziséhez. (Ez utóbbi két vegyület szintézise a kandidátusi értekezésem egyik témája volt.)<sup>20,21</sup>



6. ábra: Heterobifunkcionális spinjelzők szintézise

## 2.2. Saját eredmények

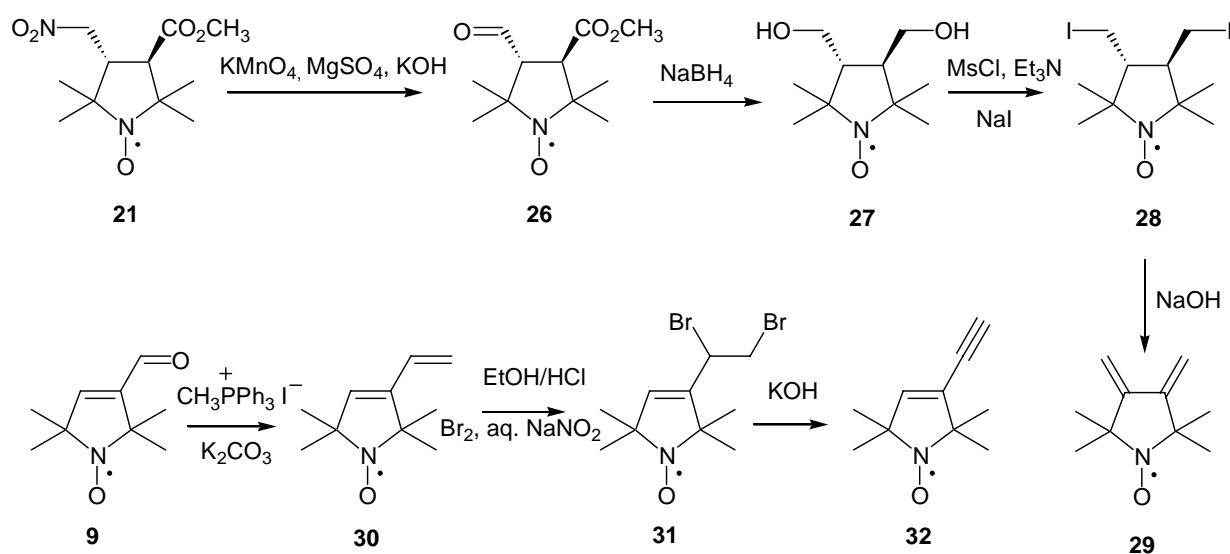
A 2.1. fejezetben ismertett vegyületekből kiindulva szélesebb körben alkalmazható paramágneses intermedierek szintézisét kívántuk megvalósítani. Egyik fő célkitűzésünk a bifunkcionális spinjelző vegyületek szintézise mellett a fokozott reakciókészségű, szén-szén kötés kialakítására alkalmas nitroxidok szintézise volt.



## 2.2.1. Új, kulcsintermedier nitroxidok szintézise

### *Szimmetrikus paramágneses dién és acetilénvegyület szintézise*

A kulcsintermedierek szintézise során igazi kihívást jelentett egy szimmetrikus paramágneses dién szintézise. A **21** vegyületből kiindulva  $\text{KMnO}_4$ -tal bázis jelenlétében végzett Nef-reakcióban jutottunk **26** aldehid észterhez. Ennek redukciója a **27** diolt adta, amit meziláton keresztül **28** dijódegyületté alakítottunk. Ez utóbbi lúgos közegben végzett eliminációja a rögzített *s-cisz* konformációjú, paramágneses **29** szimmetrikus diént eredményezte (13% termelés 5 lépés után). Ettől a vegyülettől jobb reakciókészséget reméltünk, mint a korábban publikált **30** aszimmetrikus származéktól.<sup>22</sup> További előnyt jelent, hogy aszimmetrikus dienofil estén elkerülhető a regioizomerek képződése. A **30** aszimmetrikus dién brómaddíciója **31** dibrómeget adta, majd ebből eliminációs reakcióban **32** acetilénvegyület keletkezett (7. ábra).<sup>1</sup>

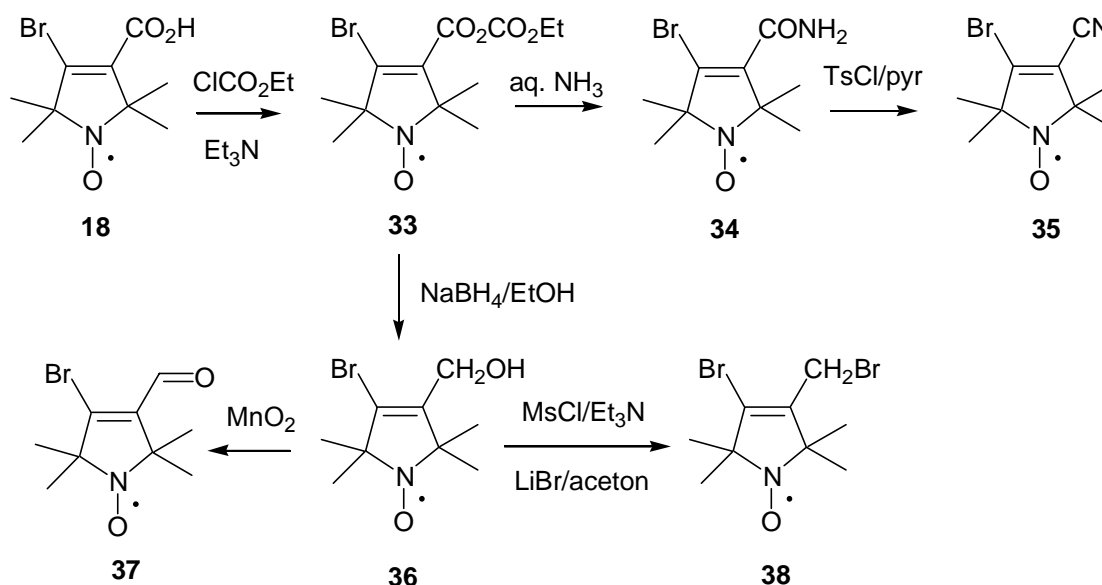


7. ábra: A szimmetrikus paramágneses dién és az acetilénvegyület szintézise.

### *A paramágneses vinilhalogénvegyületek szintézise és reakciói*

Továbbfejlesztettük Rozancev és munkatársai által bevezetett,<sup>17</sup> 3,4-diszubsztituált, a 4-es helyzetben brómatomot tartalmazó pirrolin nitroxidok szintézisét. A **18** karbonsavat klórhangyasav-etil-észterrel **33** aktív észterre alakítottuk. Ebből ammónia hozzáadásával **34** amidhoz, ennek vízeliminációjával **35** nitrilhez jutottunk, 3 lépés után 21%-os termeléssel. A

**33** aktív észter redukciója a **36** alkoholt szolgáltatva 62%-os termeléssel. Ezt aktív  $\text{MnO}_2$ -dal **37**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehiddé oxidáltuk közepes (44%) hozammal, illetve **36** alkoholt meziláton keresztül **38** brómvegyületté alakítottuk 67%-os termeléssel (8. ábra).<sup>II</sup>

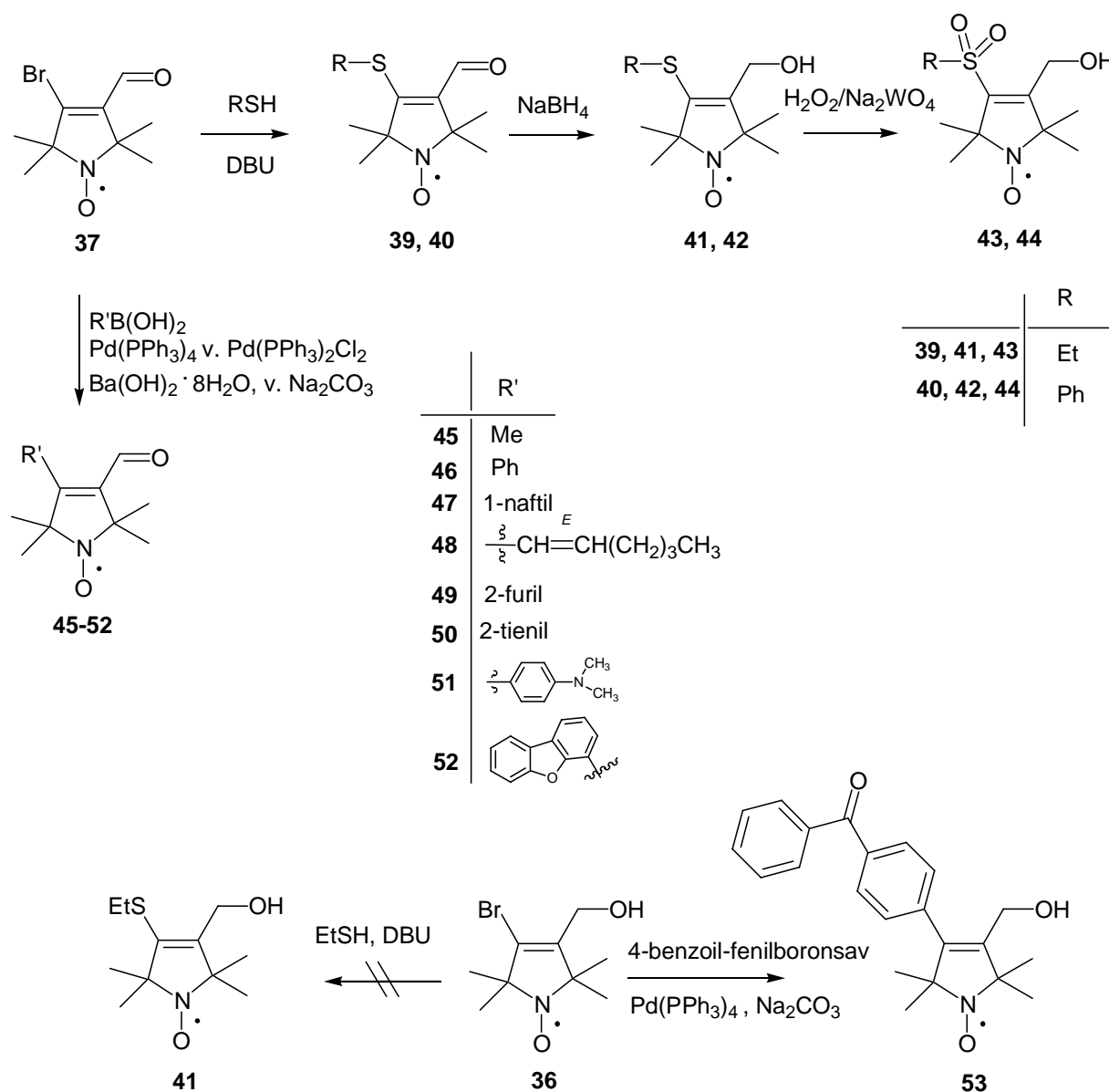


8. ábra: 3-szubsztituált-4-bróm-pirrolin nitroxidok szintézise

A **37** vegyület azért bizonyult fontos intermedierek, mert tiolokkal 1,1 ekvivalens DBU hozzáadásával a **39** 4-es helyzetben *S*-etil- illetve **40** *S*-arilcsoportot tartalmazó  $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehidek alakíthatók ki 75-82%-os termeléssel. Így a pirrolin gyűrű 4-es helyzetébe szinte tetszőleges polaritású és térkitöltésű csoport építhető be. A **39**, **40** molekulák továbbmódosíthatók, ha az aldehidek redukciójával kapott **41**, **42** alkoholokat  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  katalizálta reakcióban hidrogén-peroxiddal **43** ill. **44** szulfonokká oxidáljuk.<sup>II</sup>

A szén-kén kötés kialakításán túl a **37** aldehid alkalmas a szén-szén kötés kialakítására is. Így palládium katalizált Suzuki-reakcióban<sup>23-25</sup> a megfelelő alkil- ill. arilboronsavakkal a pirrolingyűrű 4-es helyzetébe csaknem tetszőleges alkil- ill. arilcsoport építhető be, amint **45-52** vegyületek szintézise is mutatja. A Suzuki-reakció alkalmazása a pirrolin nitroxidok estében azért volt áttörés, mert a nitroxid jelenlétében – annak megvédése nélkül – tudtunk szén-szén kötést kialakítani és így a szubsztituált **45-52** aldehideket 40-75%-os termeléssel kaptuk.<sup>III</sup> A több közleményben is leírt nitroxid-palládium komplex<sup>26,27</sup> a Suzuki-reakció körülményei között feltehetően nem stabilis, így katalitikus mennyiségű (5-10%) Pd(II)- illetve Pd(0)- komplexekkel katalizálható volt az átalakulás.<sup>III</sup> A Suzuki-reakció további előnye, hogy az átalakítás a **36** alkoholból is elvégezhető Pd( $\text{PPh}_3$ )<sub>4</sub>-nal katalizált reakcióban és a 4-benzoil-fenil-boronsavval **53** 3,4-diszubsztituált vegyülethez jutottunk.<sup>IV</sup> A Suzuki-

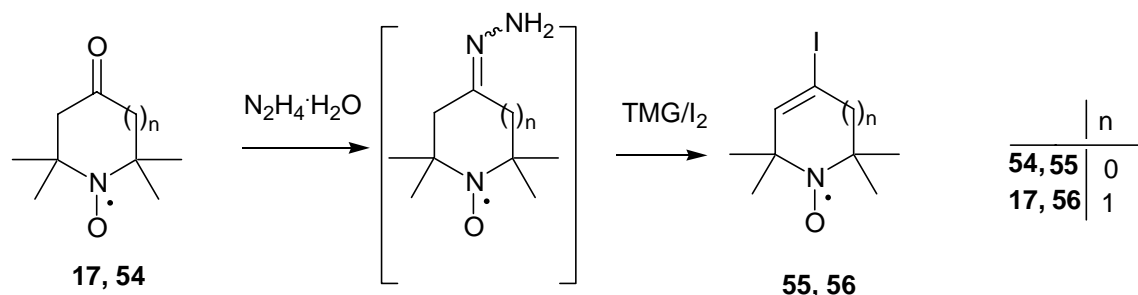
reakció előnye, hogy tetszőleges vinil-halogeniddel elvégezhető volt, míg a tiolvegyületek konjugált addíciója a karbonilcsoporttal nem aktivált **36** vegyületnél már nem játszódik le (9. ábra).



9. ábra: A  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehid szén-kén és szén-szén kötés kialakulásával járó reakciói

A **19** és **20** brómvegyületek Suzuki-reakciók hasznos kiindulási anyagainak bizonyultak, de a hipobromitoldattal végzett Favorszki-gyűrűszűkülési reakció melléktermékeinek tekinthetők. Tapasztalatunk szerint a **19** monobrómvegyület nem, vagy alacsony termeléssel (1-3%) keletkezik és kromatográfiásan el kell választani **20** dibrómszármazéktól. Ezért az **54** és **17**

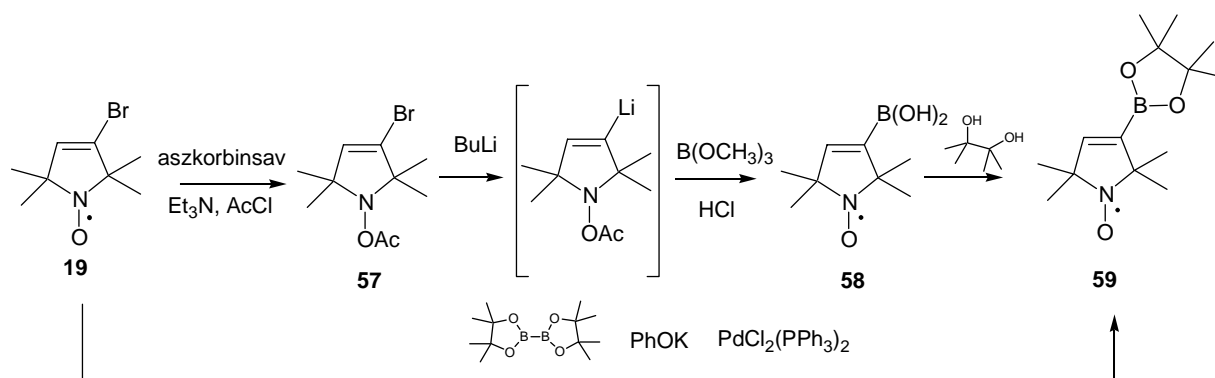
ketonokból kiindulva kidolgoztuk az öttagú (**55**) és a hattagú vinil-jódvegyületek (**56**) szintézisét a ketonok hidrazonjainak tetrametil-guanidin bázis jelenlétében végzett jódos oxidációjával<sup>28</sup> is 45-59%-os termeléssel (10. ábra).<sup>IV, V</sup>



10. ábra: Paramágneses viniljodidok szintézise

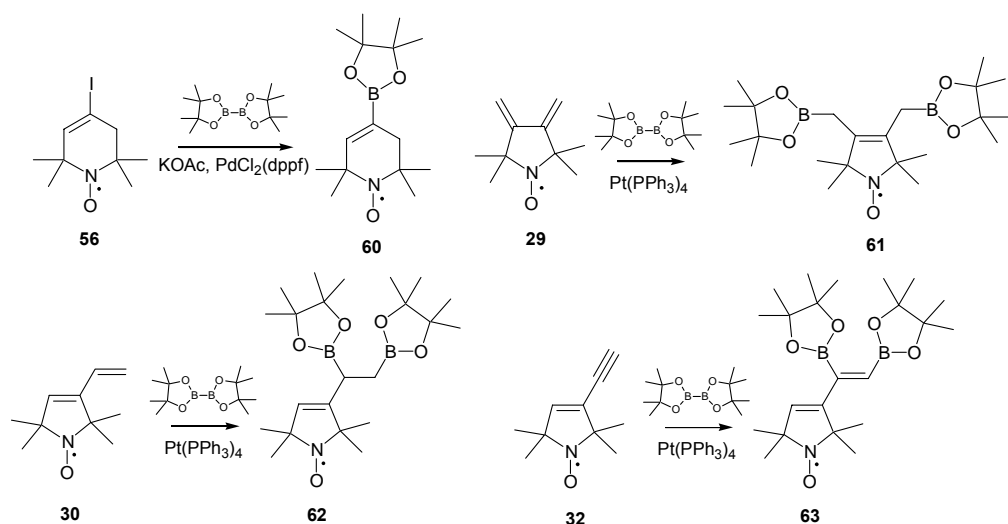
### A paramágneses boronsavak szintézise

Régóta foglalkoztatott bennünket a paramágneses boronsavak szintézisének az ötlete. A boronsavak a legkülönbözőbb keresztkapcsolási reakciókban használhatók, de jól alkalmazhatók mint vicinális diolokhoz, szénhidrátokhoz kötődő reagensek is.<sup>29,30</sup> A paramágneses boronsavak szintézisére 3 módszert sikerült alkalmaznunk.<sup>31</sup> A **19** vinil-bromidból **57** *O*-acetilvegyületet alakítottuk ki, amit litiálással a megfelelő vinil-lítiummá alakítottunk,<sup>32</sup> majd ezt reagáltatva a trimetil-boráttal savas hidrolízis után kaptuk 47%-os termeléssel az **58** vinil-boronsavat.<sup>VI</sup> Ezt a könnyebb izolálhatóság és tisztíthatóság miatt pinakollal **59** észterré alkítoztuk.<sup>33</sup> (A védőcsoport alkalmazására az *O*-butilszármazék képződésének megakadályozása miatt volt szükség.<sup>19</sup>) A **19** vegyületből egy egy lépéses reakcióban boronsav-bisz(pinakolil)-észterrel, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> katalizátorral és kálium-fenolát jelenlétében<sup>34</sup> szintén **59** észtert kaptuk 45%-os termeléssel (11. ábra).



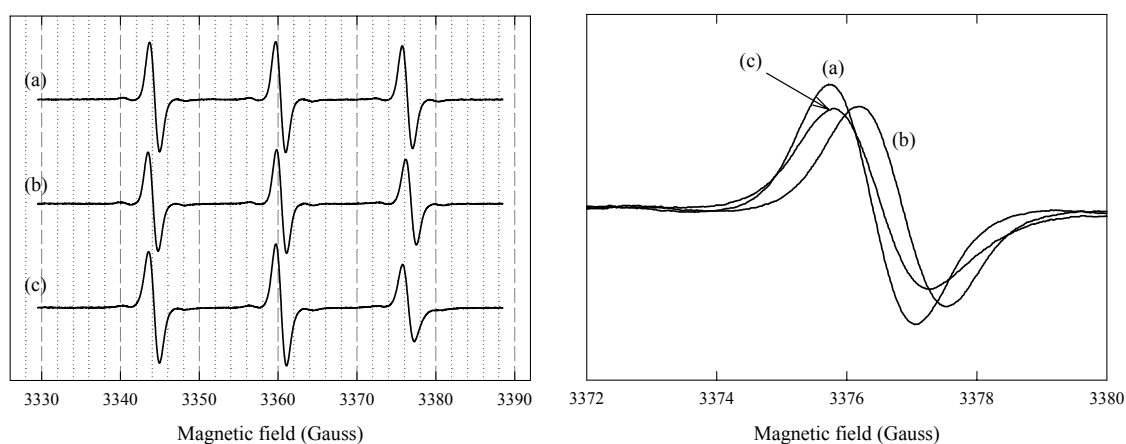
11. ábra: Öttagú paramágneses boronsavak szintézise

Az **56** vinil-jodidból csak a keresztkapcsolásos módszerrel tudtuk kialakítani a **60** hattagú paramágneses vinil-boronsavat, kálium-acetátot, boronsav-bisz(pinakolil)-észtert és  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$  katalizátort használva, 28%-os termeléssel.<sup>IV</sup> A boronsav-bisz(pinakolil)-észter telítetlen vegyületekre (**29**, **30**, **32**) történő addíciója  $\text{Pt}(\text{PPh}_3)_4$  katalizátor jelenlétében<sup>35</sup> **61-63** allil- ill. vinil-boronsav-észtereket eredményezett 38-63%-os termeléssel (13. ábra).



12. ábra: Hattagú és öttagú paramágneses boronsavak szintézise.

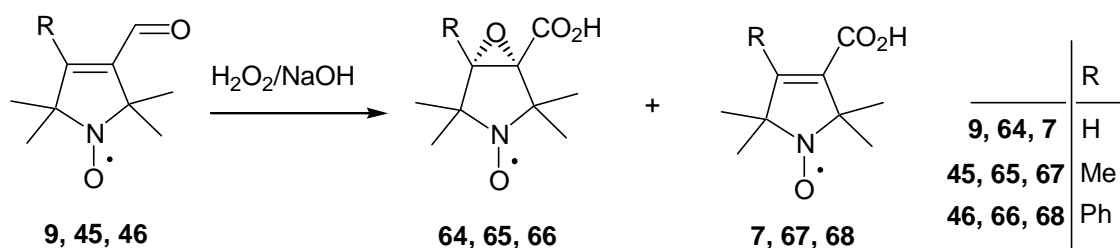
Az **58** boronsavról sikerült bebizonyítani, hogy poliszacharidhoz (pl. inulin) kötődik és így spinpróbaként alkalmazható, ahogy ez az ESR spektrum változásából (vonal kiszélesedés és a csatolás változása) látható (13. ábra).



13. ábra: Az **58** vegyület ( $9.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) ESR spektruma (a) foszfát pufferban ( $\text{pH} = 6.9$ ); (b) **58** boronsav ( $9.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) + 40 mM fruktóz foszfát pufferban; (c) **58** boronsav ( $9.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) + 10 mM inulin foszfát pufferban és a spektrum 3372-3380 G kinagyított (166 %) tere.

### Paramágneses epoxi-karbonsavak szintézise

A **9**, **45** és **46** aldehideket lúgos közegben hidrogén-peroxiddal oxidálva<sup>36</sup> **64-66** epoxi-karbonsavak (80-92%) és melléktermékként **7**, **67**, **68** karbonsavak is keletkeznek. A pirrolidinnel anellált epoxigyűrű meglehetősen stabilisnak bizonyult, pl. mind savas, mind lúgos közegben (pH= 2-13) és redukcióval szemben is.<sup>VII</sup> Ez további származékok szintézisét tette lehetővé. Ez a molekula érdekes átmenetet képez a nitroxidokkal anellált heterociklusok és a 3,4-diszubsztituált pirrolidin nitroxidok között, hiszen az epoxigyűrű oxigénje pl. hidrogénkötés kialakítására képes (14. ábra).

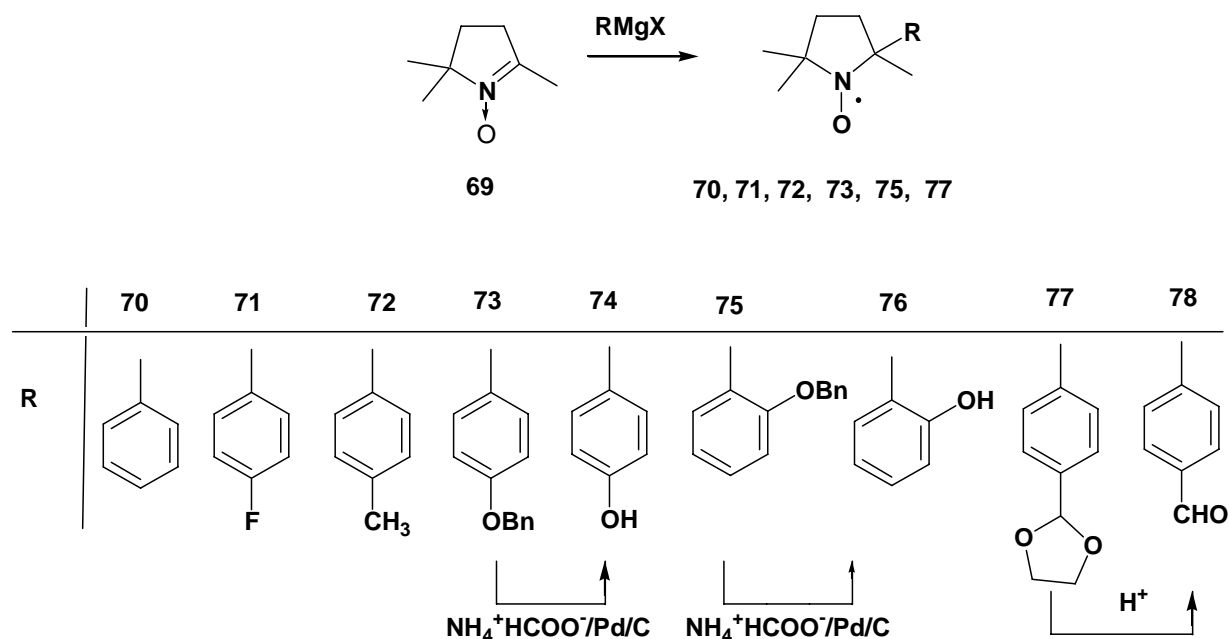


14. ábra: Az epoxi karbonsavak szintézise aldehidekből

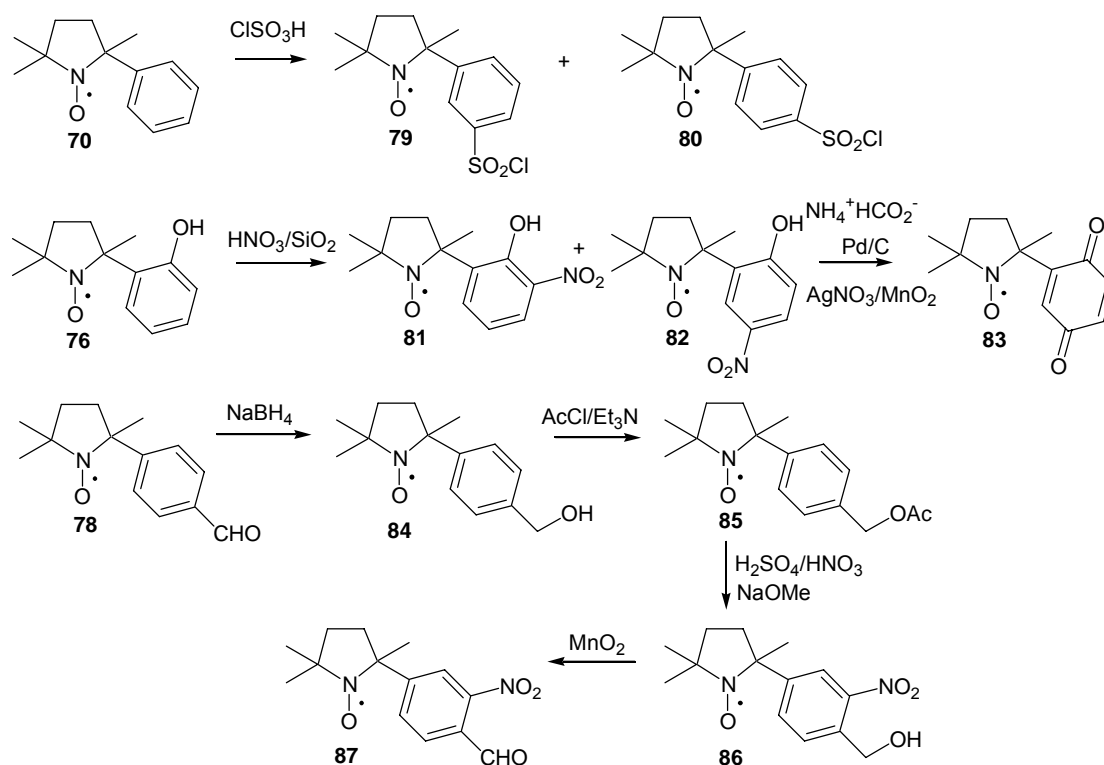
### A pirrolidin nitroxidok szintézise nitronokból

A nitroxidok szintézisének egyik módja, hogy a 2,5,5-trimetil-1-pirrolin-1-oxid (**69**)<sup>37</sup> nitront Grignard-reagenssel, vagy a megfelelő aril- vagy alkilítiummal reagáltatjuk, majd a képződő *N*-hidroxilamint MnO<sub>2</sub>-dal gyökké oxidáljuk.<sup>38</sup> Intézetünk munkatársai az 1980-as években az előállított 1-oxil-2-fenil-2,5,5-trimetil-pirrolidin (**70**) és az 1-oxil-2-(4-fluor-fenil)-2,5,5-trimetil-pirrolidin (**71**) szintézisét és utólagos funkcionálizálását (nitrálását) közölték.<sup>39</sup> A legutóbbi munkáinkban a megfelelően védett és funkcionálizált aril-Grignard-reagenssekkel reagáltatva **69** nitront, majd a hidroxilamin MnO<sub>2</sub>-os oxidációja után a **72** 1-oxil-2-(4-tolil)-2,5,5-trimetil-pirrolidin illetve a védőcsoportokat eltávolítva **74** és **76** fenolokhoz és **78** aldehidhez jutottunk 12-62%-os termeléssel 1 vagy 2 lépéses reakcióban (15. ábra).<sup>VIII</sup> A kapott 2-aril-2,5,5-trimetil-pirrolidin nitroxidokat utólag aromás elektrofil szubsztitúcióval is módosítottuk. A **70** vegyületből klórszulfonálási reakcióban a **79 meta**-származék és a **80 para**-származék 2:1 arányban képződött, amint azt a szulfonsavkloridokból képzett glicin-származékok NMR vizsgálata bizonyította. A **76** fenolt nitrálva a **81** 1,2,3-trisubsztituált benzolszármazékot és a **82** 1,2,4-trisubsztituált benzolszármazékot kaptuk 1:1 arányban. A **82 para**-nitrofenol származékot redukálva, majd a kapott 4-aminofenolt AgNO<sub>3</sub>-tal és MnO<sub>2</sub>-dal oxidálva a **83** paramágneses 1,4-benzokinonhoz jutottunk.<sup>VIII</sup> A **78** paramágneses benzaldehidet **84** benzil-alkohollá redukáltuk, ezt kénsav/salétromsav eleggyel kezelve a **78**

aldehid képződéséhez vezetett a várt nitrálódás helyett. Ezért a benzil-alkoholt *O*-acetátként megvédve, majd a kapott **85** acetátot nitrálva és az észtert elszappanosítva jutottunk 42%-os termeléssel a **86** paramágnesesen módosított 2-nitro-benzil-alkoholhoz.<sup>IX</sup> Ezt oxidálva kaptuk a **87** paramágneses 2-nitro-benzaldehydet, amely további reakciók kulcsvegyületének bizonyult (16. ábra).

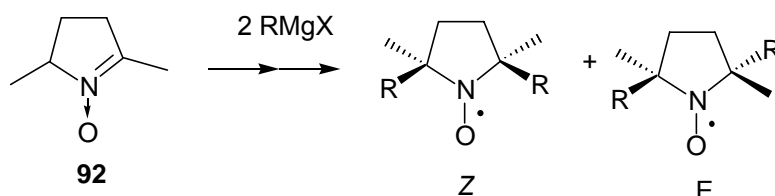


15. ábra: 1-Oxil-2-aril-2,5,5-trimetil-pirrolidin vegyületek szintézise



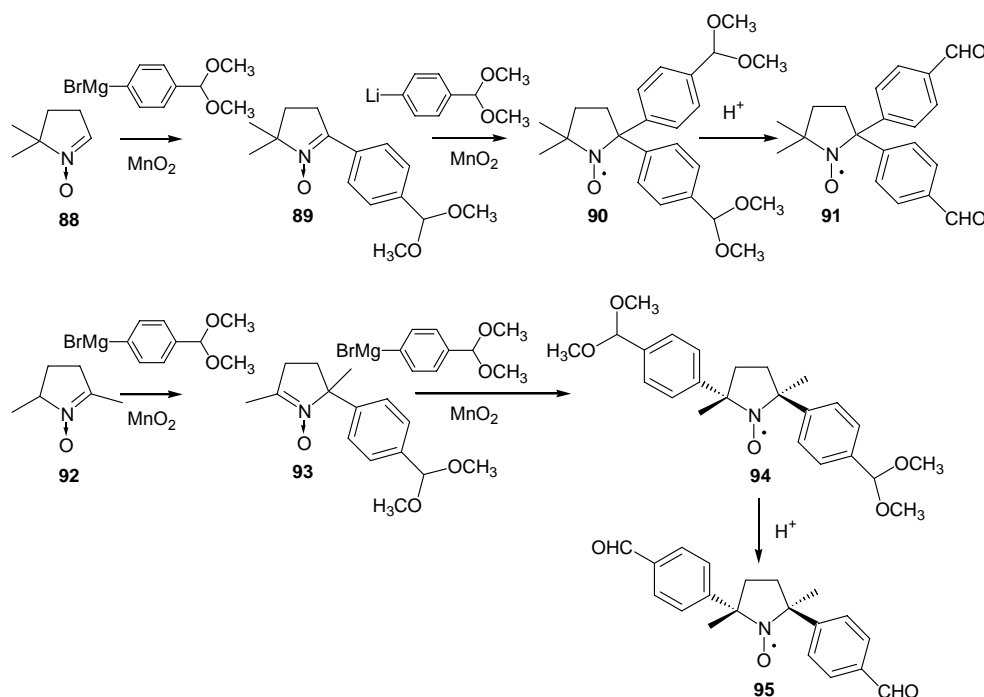
16. ábra: 1-Oxil-2-aril-2,5,5-trimetil-pirrolidin további kulcsvegyületei

A **88**<sup>40</sup> ill. **92**<sup>41</sup> nitronokból Grignard-reakcióval 1-oxil-2,2-diszubsztituált-5,5-dimetil-pirrolidin ill. 1-oxil-2,5-diszubsztituált-2,5-dimetil-pirrolidin készíthető. Intézetünk és a Max-Planck Intézet (Polimer Kutatócsoport, Mainz) kutatóinak korábbi munkáiból<sup>42,43</sup> kiderült, hogy **92** nitronból alkil-Grignard-reagenssel mind *transz* (*E*) mind *cisz* (*Z*) relatív konfigurációjú izomerek keletkeznek, míg az aril-Grignard-reagenssel sztereoselektíven csak az *E*-izomerek keletkeznek (17. ábra).



17. ábra: **92** Nitronból Grignard-reakcióval képződő nitroxidok lehetséges relatív konfigurációi

Az 5,5-dimetil-1-pirrolin-1-oxid (**88**) nitront a 4-dimetoxi-metil-fenil-magnézium-bromiddal reagáltatva, majd a képződő *N*-hidroxilamint oxidálva **89** nitronhoz jutottunk. A második arilcsoport bevezetése - feltehetőleg szterikus okok miatt - csak a nagyobb reaktivitású aril-lítium reagenssel volt lehetséges. Az *N*-hidroxilamin oxidációjával kapott **90** nitroxid dimetil-acetál védőcsoportját savas hidrolízissel eltávolítva **91** 1-oxil-2,2-bisz(4-formil-fenil)-5,5-dimetil-pirrolidint kaptuk. Hasonló módon a **92** nitronból Grignard-reakcióval a **95** *transz*-1-oxil-2,5-bisz(4-formil-fenil)-2,5-dimetil-pirrolidint kaptuk (18. ábra).<sup>X</sup>



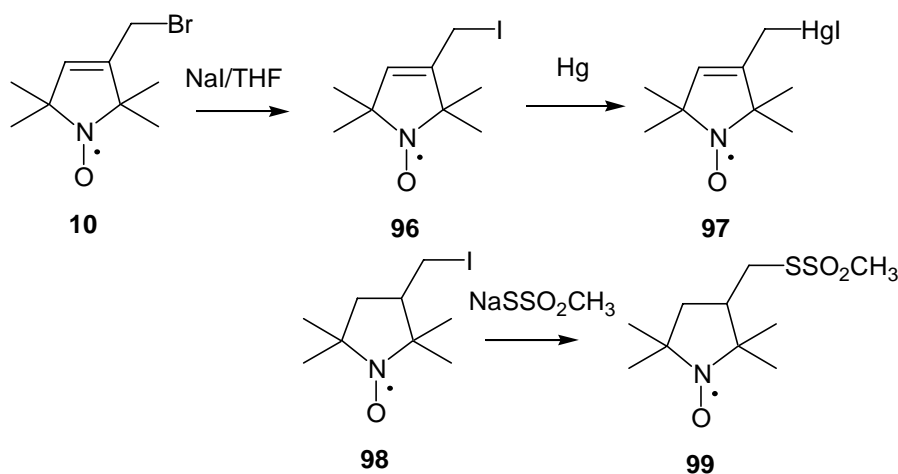
18. ábra: 1-Oxil-2,2-bisz(4-formilfenil)- és az 1-oxil-2,5-bisz(4-formilfenil)pirrolidin nitroxidok szintézise



## 2.2.2. Új, spinjelző vegyületek szintézise és alkalmazása

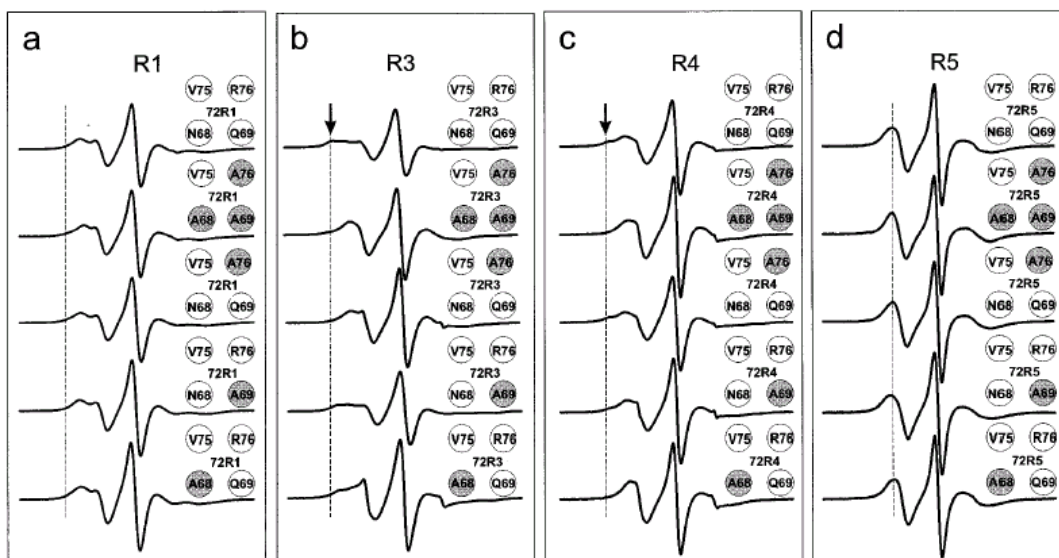
### *SH-reaktív, monosubsztituált spinjelző vegyületek szintézise*

Egyik fő törekvésünk a bevezetőben már említett, SH-reaktív **11** (HO-225) vegyület továbbfejlesztése volt. Azt vizsgáltuk, hogy a reagáló csoport megváltoztatása hogyan befolyásolja a reagensek szelektivitását. A **10** paramágneses allil-bromidból előállított **96** allil-jodid vegyületből elemi higannyal Larock módszerével<sup>44</sup> 39%-os termeléssel nyertük **97** allil-higany-jodidot. A **98** telített jódvegyületből NaSSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-tal DMSO-ban melegítve 30%-os termeléssel kaptuk **99** telített metántioszulfonátot (19. ábra).<sup>XI</sup> Időközben a rezolvált telített alkoholból az R-(+)-**99** és az S-(-)-**99** enantiomer párokat is előállítottuk.<sup>45</sup>



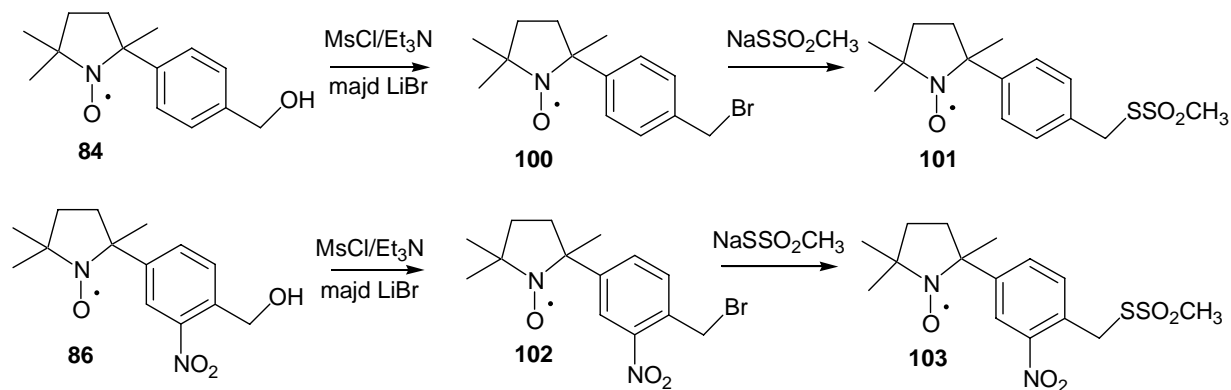
19. ábra: SH-reaktív nitroxidok szintézise.

A vegyületeket a Los Angeles-i Egyetem Kémia és Biokémia Intézetében Wayne Hubbell professzor és munkatársai tesztelték T4 lizozim cisztein pontmutánsain. A vizsgálatok során azt találták, hogy a **99** spinjelző vegyület esetében nem jelenik meg az ESR spektrumban egy mobilis és egy immobilis populáció (20. ábra), továbbá **97** és **99** vegyületekkel a fehérje felszínén elhelyezkedő ciszteinek jelölésekor sokkal élesebb vonalakat kaptak, mint **11** esetében. A **97** és **99** vegyületek a fehérjék másodlagos szerkezetének felderítésére alkalmasabbak, mint a **11** vegyület.



20. ábra: A Lizozim T4 72-es helyén ciszteinnel módosított mutánsainak jelölése **11 (R1)**, **96 (R3)**, **97 (R4)** és **99 (R5)** vegyületekkel (legfelső spektrumok). A többi esetben a 68-76 helyzetű aminosavak némelyikét – az eredeti cisztein mutáció megtartása mellett - az apoláris alaninra cserélve (szürke körök) vizsgálták.<sup>XI</sup>

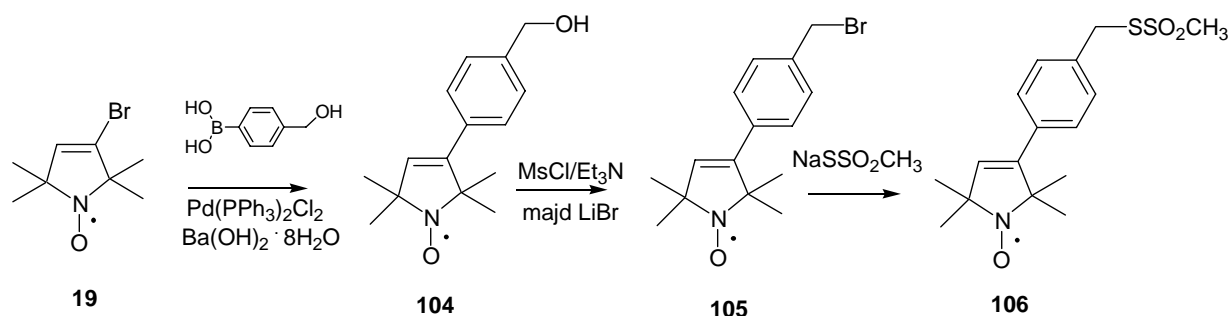
További monofunkcionális „benzil-típusú” spinjelzőket szintetizáltunk **84** és **86** vegyületek metánszulfonsav észtereinek nukleofil szubsztitúciójával, majd a halogénvegyületek (**100**, **102**) SH-reaktív csoportra történő cseréjével (15-23% termelés 3 lépéses folyamatban) (22. ábra).



22. ábra: A benzil típusú SH-reaktív spinjelzők szintézise

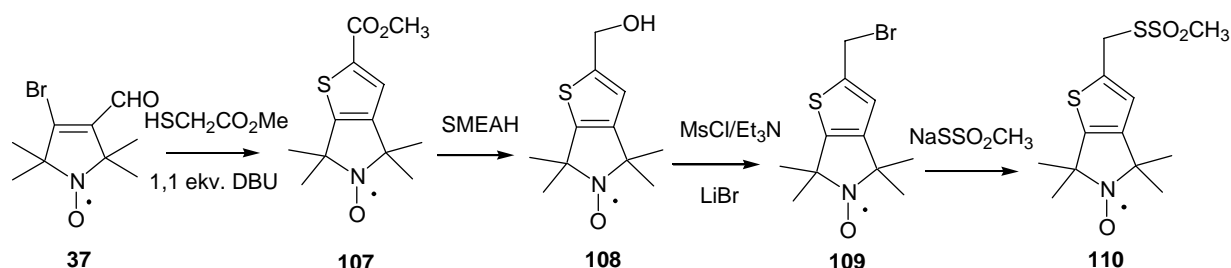
Hasonlóképpen jártunk el a **19** vegyület és a 4-hidroximetil-fenil-boronsav Suzuki-reakciójával nyert **104** vegyületből előállított **106** metántiosulfonát szintézisénel (22. ábra). Az elgondolásunk ezen új spinjelző vegyületek kifejlesztésénél az volt, hogy a **101**<sup>VIII</sup> és

**106<sup>III</sup>** vegyületek más-más orientációval rendelkeznek és a **103<sup>IX</sup>** esetében számolhatunk a nitrocsoporthoz és a biomolekula között kialakuló hidrogénkötéssel is, bár ezen molekulák biofizikai alkalmazhatóságát még részletesen nem vizsgálták.



22. ábra: A benzil típusú SH-reaktív spinjelzők szintézise.

A monoszubsztituált SH-specifikus spinjelző vegyületek és a 3,4-diszubsztituált spinjelző vegyületek közötti átmenetnek tekinthető az 5-oxil-4,4,6,6-tetrametil-4,6-dihidro-5H-tieno[2,3-c]pirrolvázis vegyület. A tioféngyűrű másodlagos kölcsönhatásokat (pl.  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás aromás aminosavakkal) is képes kialakítani a környező makromolekulákkal. A **37**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítlen-aldehid Fiesselmann-reakciójával<sup>46</sup> a **107** észtert kaptuk 65%-os termeléssel. Ezt redukálva jutottunk **108** alkoholhoz, amelynek metánszulfonsav észteréből nukleofil szubsztitúciós reakciókkal állítottuk elő a **109** brómvegyületet és a **110** metántioszulfonátot (23. ábra).<sup>II</sup>

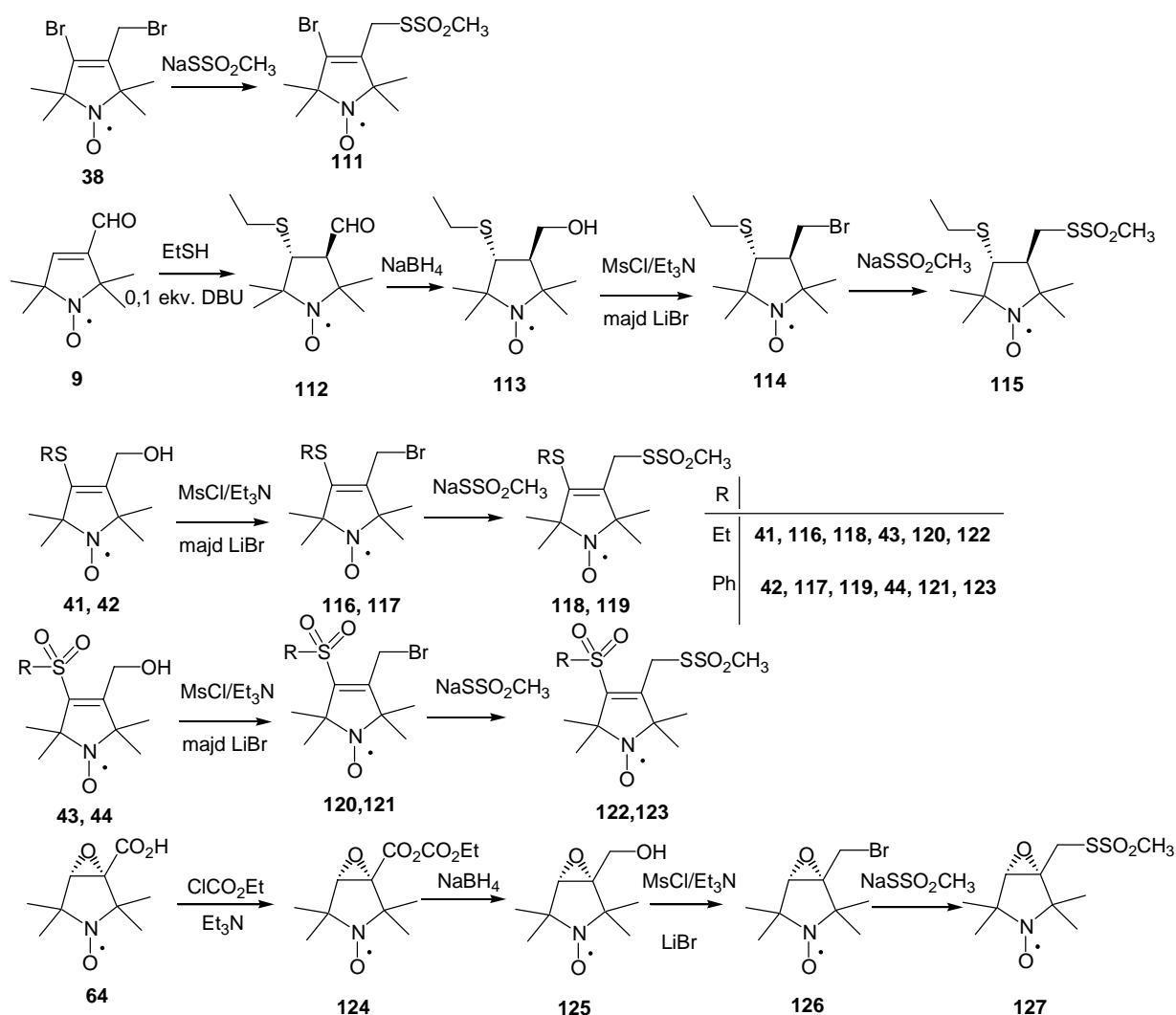


23. ábra: Nitroxiddal kondenzált tioféngyűrűt tartalmazó SH-reaktív reagens szintézise.

### Egy SH-reaktív csoportot tartalmazó, 3,4-diszubsztituált spinjelző vegyületek szintézise

Az egy SH-reaktív csoportot tartalmazó diszubsztituált spinjelző vegyületek egyik szubsztituense kovalens kötés kialakítására alkalmas, míg a pirroli(di)n gyűrű 4-es helyzetében levő szubsztituens a másodlagos kölcsönhatások révén csökkenti a gyűrű sajátmozgását. A második szubsztituens többféleképpen építettük be. A  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen-karbonsavból kialakítottuk **38** allil-brómvegyületet, utóbbiból pedig a **111<sup>II</sup>** metántioszulfonátot 44%-os hozammal. Ennek a spinjelzőnek maga a 4-es helyzetű brómatom

a gyűrű sajátmozgását lecsökkentő szerkezeti eleme. A **9** telítetlen aldehidre történő bázis katalizált Michael-addíció a **112** aldehidet adta, ebből redukcióval kapott alkohol mezilátján keresztül szubsztitúciós reakciók során jutottunk el **115** metántioszulfonáthoz. A keletkezett spinjelző reagens két aszimmetria centrumot tartalmaz. Ez elkerülhető volt, ha a **37** vegyületből addíciós- eliminációs reakciók, majd redukció után kapott **41**, **42** alkoholokat és ezek szulfonná oxidált származékait (**43**, **44**) reagáltattuk tovább és alakítottuk ki **118**, **119**, **122**, **123** metántioszulfonátokat, 2 ill. 4 lépéses folyamatok után 12-45%-os termeléssel.<sup>II</sup> A kettős kötés epoxidálása is lehetőséget nyújtott egy újabb szubsztituens bevitelére. A **9** aldehdből kialakított **64** epoxi-karbonsav **124** vegyes anhidridjét redukálva jutottunk **125** alkoholhoz, amit **126** halogénvegyületen keresztül **127** SH-szelektív reagenssé alakítottunk (24. ábra).<sup>VII</sup>

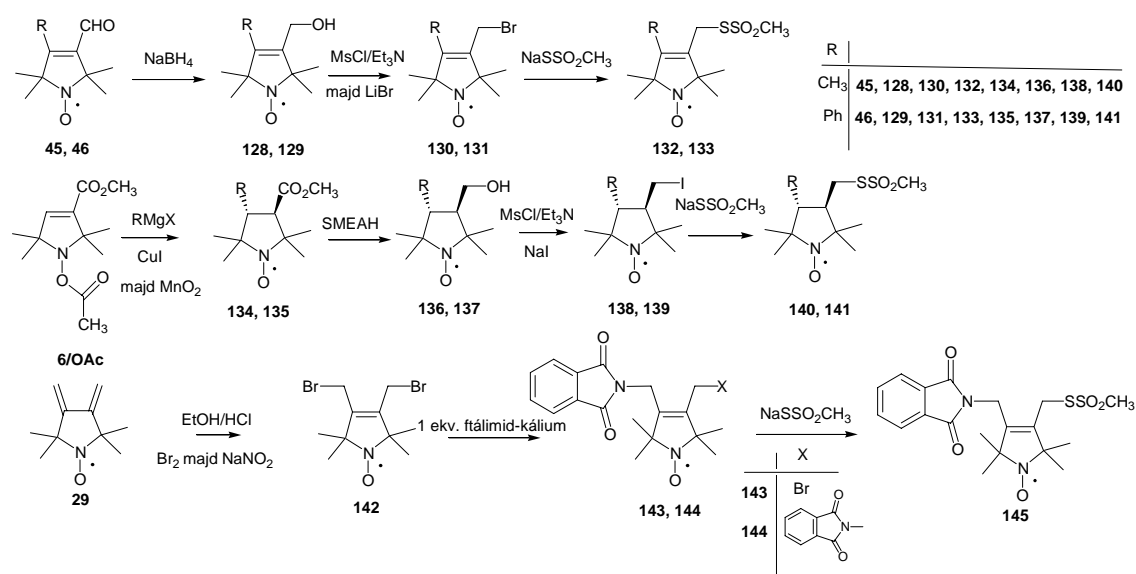


24. ábra: A 3,4-diszubsztituált, 4-es helyzetben heteroatomot tartalmazó SH-reaktív spinjelző vegyületek szintézise.

A szén-heteroatom kötés kialakítása mellett fontos kérdés volt, hogy hogyan tudunk beépíteni a gyűrű 4-es pozíciójába szén-szén kötés kialakításával egy újabb szubsztituenst. Erre a **37** brómvegyület Suzuki-reakciója volt a kényelmes megoldás, mert az újabb szubsztituenst a nitroxid funkció megvédése nélkül tudtuk beépíteni. A fejezet elején már említett Suzuki-reakcióval előállított **45-52** aldehidek továbbalakításával a 4-es helyzetben különböző (alifás, aromás, heteroaromás stb.) szubsztituenst hordozó, SH-reaktív spinjelző vegyületek voltak kialakíthatók. Biofizikai vizsgálatokban csak a metil- és a fenilszármazékok szerepeltek, így a 24. ábrán is csak az ezekből készült **132**, **133** reagensek szintézisét tüntettem fel.<sup>III, XII</sup>

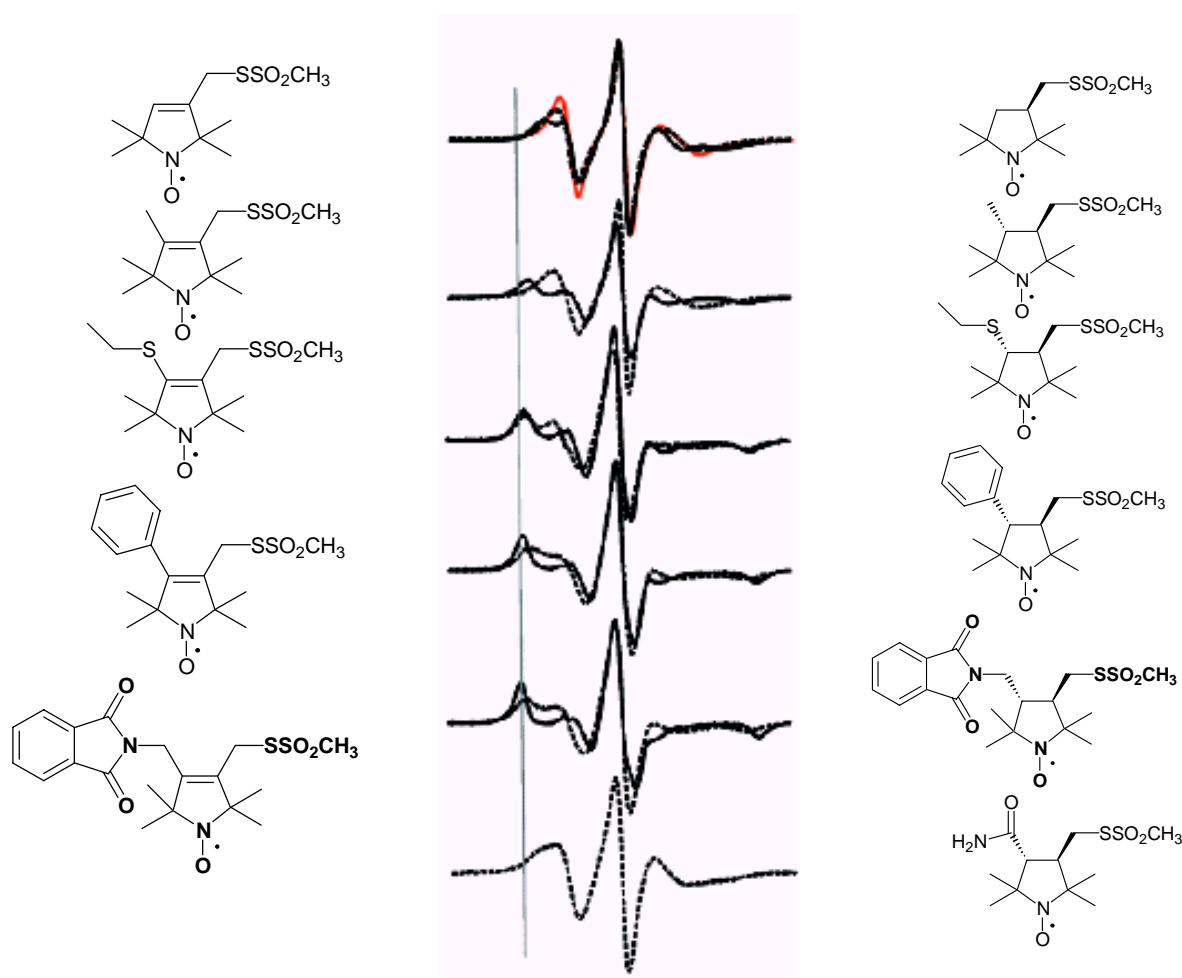
A telítetlen származékok kialakítása mellett, összehasonlítás végett szintetizáltuk a megfelelő telített származékokat is. Ezeket Grignard-reagensek CuI katalizálta addíciójával állítottuk elő **6** észterből illetve *O*-acetilszármazékából. A korábban közölt **135** észter<sup>18</sup> mellett a **134** észter szintézisét is sikerült megoldanunk azzal, hogy a nitroxidot diamágneses *O*-acetáttá alakítva az *O*-metilszármazék képződése elkerülhető volt. A **134** és **135** *transz* relatív konfigurációjú észterek redukciójával kapott alkoholokból (**136**, **137**) alakítottuk ki a **140**, **141** SH-szelektív reagenseket.<sup>XII</sup>

A **29** diénből 1,4-brómaddícióval állítottuk elő **142** dibrómvagyületet 70%-os termeléssel. Ennek parciális szubsztitúciójával jutottunk **143** vegyülethez a **144** melléktermék keletkezése mellett. A **143** ftálimidszármazékból szubsztitúciós reakcióval alakítottuk ki **145** metántioszulfonát reagenst 17%-os össztermeléssel (25. ábra).



25. ábra: A 3,4-diszubsztituált, 4-es helyzetben szénatomot tartalmazó SH-reaktív spinjelző vegyületek szintézise.

Az így kialakított 3,4-diszubsztituált telített és telítetlen, SH-reaktív spinjelző molekulákról a UCLA Kémia és Biokémia intézetével együttműködésben megállapítottuk, hogy a fehérjék más-más régióinak a módosítására és tanulmányozására használhatók.<sup>XII</sup> A telített vegyületek inkább az oldalláncok mozgását képesek követni, így inkább az oldalláncok között fellépő kölcsönhatások tanulmányozására (pl. hidrogénkötés) alkalmasak. A 4-szubsztituált pirrolin nitroxidok sajátmozgása korlátozottabb, így az ESR spektrumban a fehérjelánc mozgása tükröződik inkább. A telítetlen vegyületek, különösképpen a nagyméretű szubsztituenst tartalmazók, mint pl. **145** spinjelző vegyület a fehérje korrelációs rotációs idejének a meghatározására alkalmas. Ez a különbség a T4 lizozim 72-es ciszteinjének pirrolin (két csúcs, mobilis és immobilis populációk) ill. pirrolidin (egy csúcs a mágneses anizotrópiák kiátlagolódása miatt, ami az oldallánc-szerű gyors mozgás következménye) nitroxidokkal történő módosításából is látható (26. ábra).<sup>XII</sup>

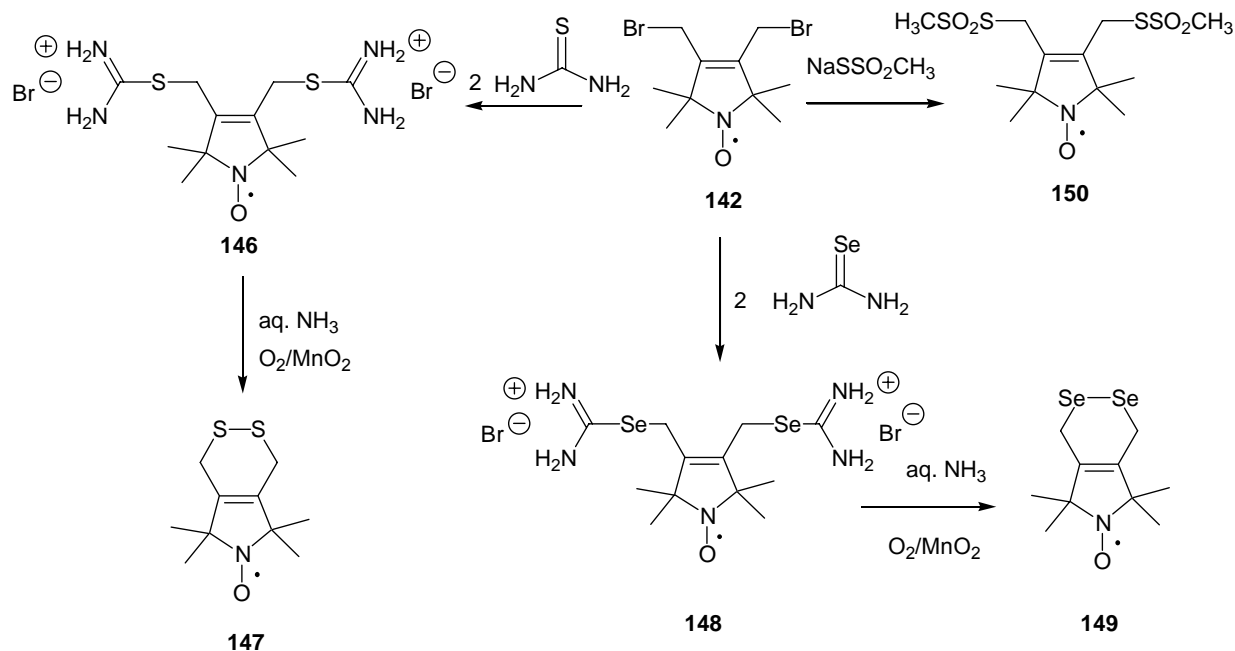


26. ábra: A 72-es T4 lizozim cisztein pontmutáns jelölése telítetlen (—) és telített (---) nitroxidokkal.

### A 3,4-diszubsztituált, homobifunkcionális, SH-reaktív keresztkötő reagensek szintézise

A keresztkötő reagenseket gyakorta alkalmazzák biokonjugációs módszerekben. A spinjelző vegyületekből kialakított keresztkötő reagenseket troponin C fehérje<sup>47</sup> és membrán vizsgálatokban<sup>48</sup> is sikeresen alkalmazták. A szimmetrikus homobifunkcionális keresztkötő reagensekkel szemben fontos követelmény, hogy a nitroxid funkciós csoportra nézve szimmetrikusak legyenek vagy a keresztkötések kialakítása úgy történjék, hogy elkerüljük a többféleképpen jelölt fehérjék csoportjainak megjelenését az ESR spektrumban.

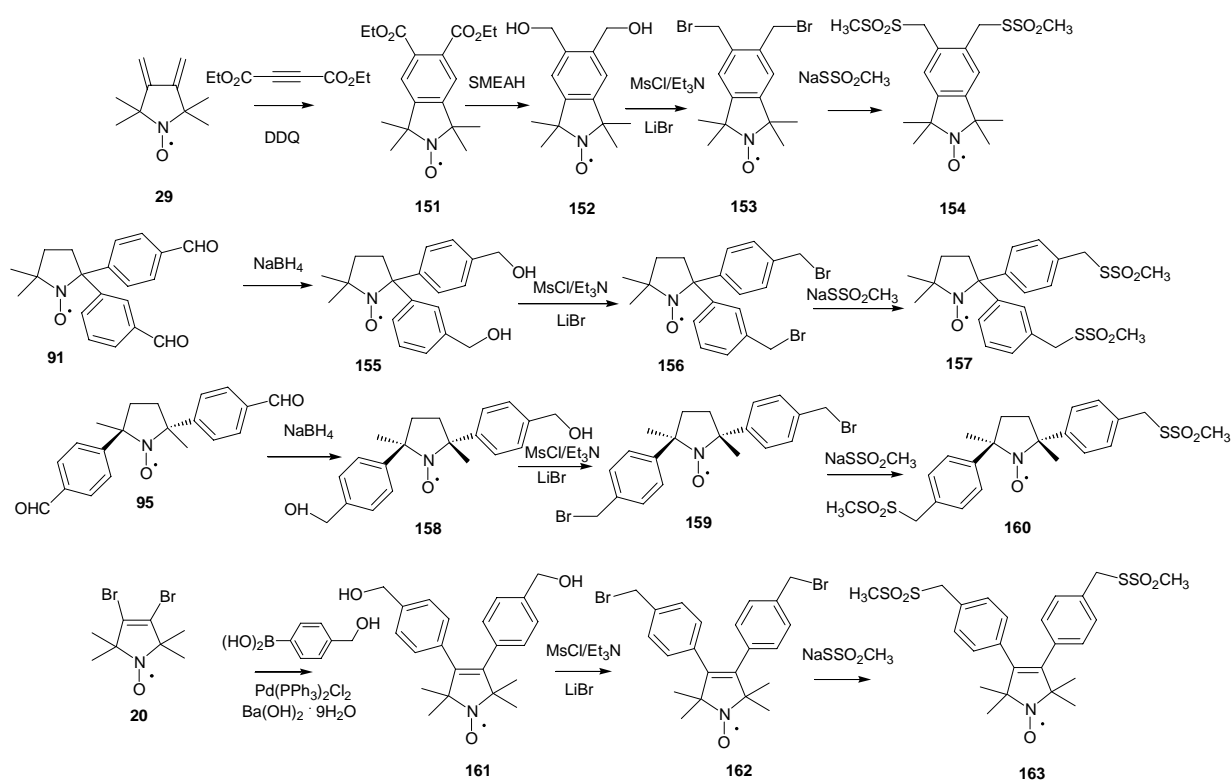
A legkézenfekvőbbek **142** dibrómvegyületből nukleofil szubsztitúciós reakcióival, 58-80%-os termeléssel kialakított SH-szelektív **150** bisz(metántioszulfonát), **146** és **148** bisz(izotiorúrionium) és bisz(izoszelenurúrionium) sók voltak.<sup>1</sup> A korábban közölt monoizotiorúrionium sókkal<sup>49</sup> szerzett tapasztalatok szerint a sók a tiolokkal lassabban reagálnak **150** vegyülethez viszonyítva, viszont jobban oldódnak vízben. A **146**, **148** izourúrionumsókból felszabadított ditiol- ill. diszelenol- vegyületek már enyhe oxidáció hatására is intramolekuláris diszulfiddá (**147**) ill. diszeleniddé (**149**) ciklizálhatók (27. ábra). Az előkísérletek azt mutatják, hogy ezek is képesek keresztkötések kialakítására.



27. ábra: Bisz(allil) típusú SH-reaktív, homobifunkcionális keresztkötő reagensek kialakítása.

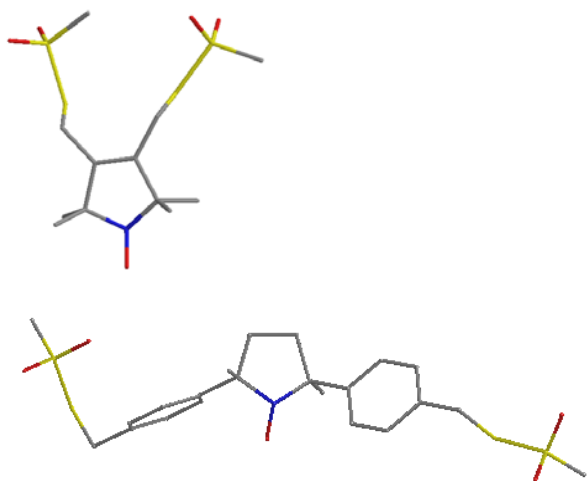
A keresztkötő reagensek másik fő forrása a bisz(benzil-halogenidek). A szimmetrikus **29** dién Diels-Alder-reakciója, majd az azt követő oxidáció a **151** paramágneses ftálsavésztert

eredményezte 27%-os össztermeléssel.<sup>I</sup> Ennek redukciójával, majd nukleofil szubsztitúciós reakciók sorozatán keresztül jutottunk a **154** keresztkötő reagenshez (28. ábra).<sup>XIII</sup> Azonban mind **150**, mind **154** molekula a számítógépes modellszámítások (geometriai optimalizálás) szerint legfeljebb 4-5 Å távolságot képes áthidalni. Ezt a problémát jól lehetett orvosolni a **91** és **95** bisz(benzaldehyd) molekulák redukciójával kapott **155** és **158** vegyületek valamint **20** dibrómvegyületből Suzuki-reakcióval nyert **161** átalakításával (28. ábra). A **157**, **160**,<sup>IX</sup> **163**<sup>III</sup> keresztkötő spinjelző vegyületek már 9-13 Å távolság áthidalására képesek (1. táblázat, és 29. ábra). Így alkalmasak intra- vagy interhelikális keresztkötések kialakítására is, amely lehetővé teszi az aminosavlánc konformációs mozgásának vagy fehérje alegységek egymáshoz viszonyított mozgásának a követését. A keresztkötő homobifunkcionális spinjelző vegyületekkel a vizsgálatok még folyamatban vannak. A két aromásgyűrűt tartalmazó spinjelző vegyületek hátránya a korlátozottabb vízzoldhatóságuk.



28. ábra: A bisz(benzil) típusú SH-specifikus keresztkötő reagensok szintézise.





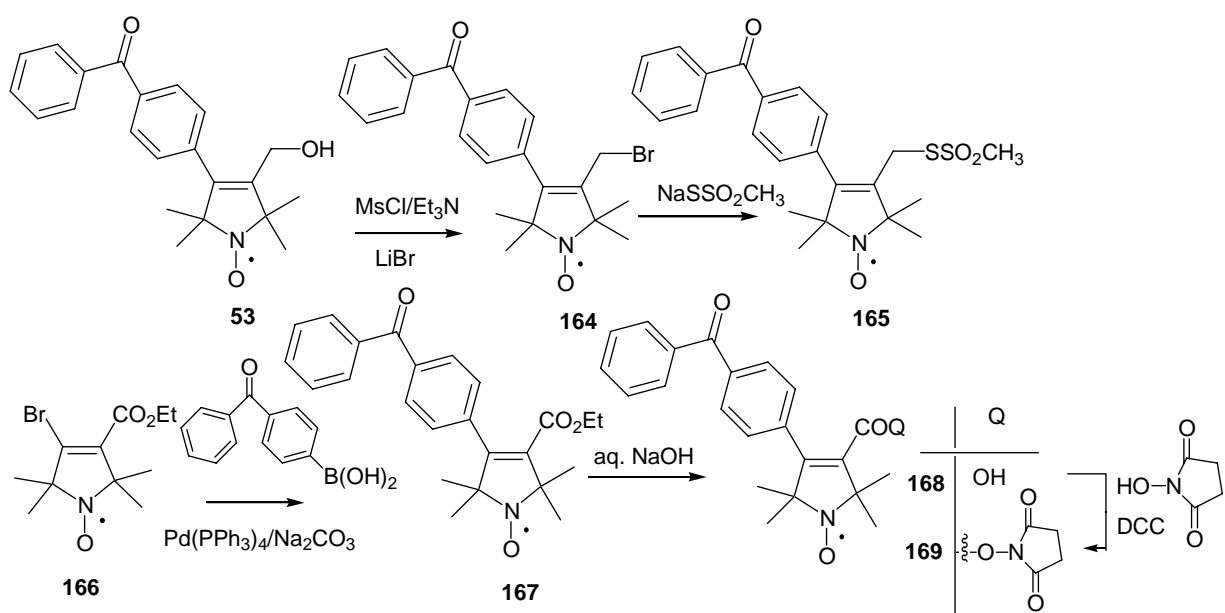
**1. Táblázat:** A homobifunkcionális keresztkötő reagensek által áthidalható távolság

Vegyület	A ciszteinnel reagáló kénatomok távolsága (Å)
<b>150</b>	3,6
<b>154</b>	3,7
<b>157</b>	9,5
<b>160</b>	13,5
<b>163</b>	10,7

29. ábra: A **150** és **160** vegyületek háromdimenziós ábrázolása ChemDraw3D program segítségével, egyszerű geometriai-optimalizálással.

#### ***A heterobifunkcionális keresztkötő SH-reaktív és fotoaffinitás reagensek szintézise***

Az fotoaffinitás reagensek<sup>50</sup> fő előnye, hogy kovalens kötést kontrollált körülmények között (adott időben, meghatározott hullámhosszúságú fénnel történő megvilágítás) lehet kialakítani. Hátránya, hogy kevésbé szelektíven reagál a környezetében található oldalláncokkal. Ha a keresztkötő reagensek egy „horgonyzócsoporton” (SH- vagy NH<sub>2</sub>-reaktív csoporton) keresztül kapcsolódnak fehérjéhez, a fotoaktiválással létrehozott keresztkötéssel vizsgálhatjuk pl. a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, a fehérje alegységek távolságát és konformációs viszonyait agonista vagy ion-kötődés esetén. Mindezek a folyamatok ESR spektroszkópiával is követhetővé válnak, ha a fotoreaktív csoport és a horgonyzócsoport közé egy paramágneses összekötő csoportot helyezünk. Ilyen keresztkötő reagenseket már korábban is előállítottunk, de a **24** és **25** vegyületeket csak 6-8 lépéses folyamatban, védőcsoportok alkalmazásával sikerült kialakítani. A Suzuki-reakcióval 4-benzoil-fenil-boronsavból kialakított fotoaktiválható benzofenonnal kevesebb lépésben, jobb össztermeléssel (16-30%) lehetett előállítani **53** alkoholból és **167** észterből a **165** fotoaktiválható, SH-reaktív és a **169** fotoaktiválható NH<sub>2</sub>-reaktív keresztkötő reagenseket, amelyek által áthidalt távolság 6,7 Å körüli (geometriai optimalizálás, ChemDraw 3D program)(30. ábra).<sup>VI</sup>



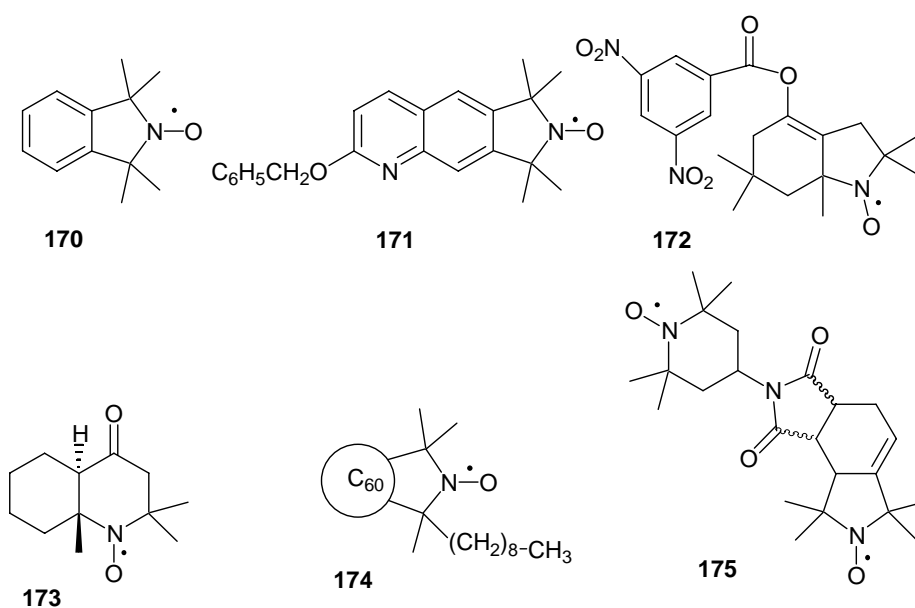
30. ábra: Heterobifunkcionális keresztkötő reagensek kialakítása.

### 3. Szénciklusokhoz és heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidok szintézise

Ebben a fejezetben főleg a pirrolin, piperidin nitroxidokkal anellált aromás heterociklusok és szénciklusok szintézisét foglalom össze. A szintézisek során elsősorban a C-C kötés kialakítására törekedtünk, azt tartva szem előtt, hogy a szén-heteroatom kialakítása bár egyszerűbb, az alapmolekula biológiai hatását esetleg kedvezőtlenül befolyásolja. Ezzel a témakörrel a spinjelzőkkel foglalkozó 2. fejezet, a biológiailag aktív paramágneses vegyületekkel foglalkozó 4. fejezet, és a kettősen jelölő vegyületekkel foglalkozó 5. fejezet is több részletben átfed. A pirrolin nitroxidokkal anellált szénciklusoknak és heterociklusoknak önmagukban, mint az oximetriában használható reagenseknek van fontos szerepük.<sup>51</sup>

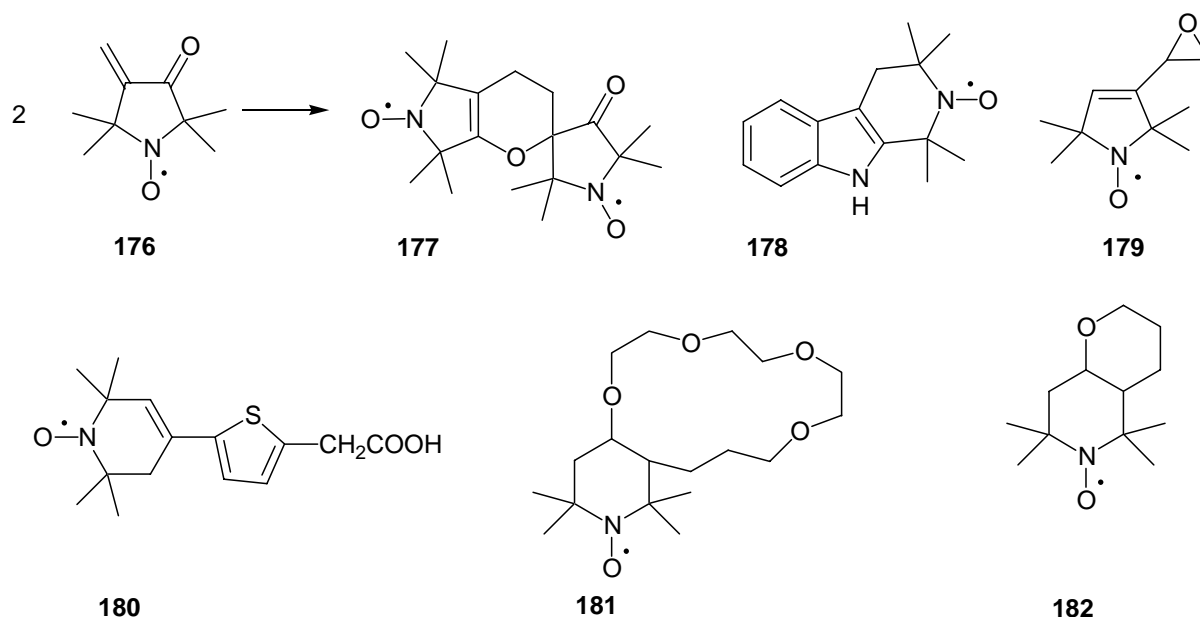
#### 3.1. Irodalmi háttér

A szénciklusokhoz és heterociklusokhoz a nitroxidok egy  $\sigma$ -kötésen keresztül vagy két  $\sigma$ -kötésen keresztül kapcsolhatók. Az utóbbi esetben a vegyületek lehetnek kondenzált- és spirovegyületek. Számos szénciklussal kondenzált nitroxidot írtak már le. Ezek közül a legfontosabbak és leginkább elterjedtek az ausztrál és amerikai kutatók által ftálimidből előállított izoindolin nitroxidok (**170**, **171**).<sup>52-54</sup> További karbociklussal anellált nitroxidokra példa a japán kutatók által előállított hexahidroindol nitroxid (**172**)<sup>55</sup> és az angol kutatók által előállított dekahidrokinolin nitroxid (**173**)<sup>56</sup>. Az 1990-es évek végén 1,3-dipoláris cikloaddícióval fullerénhez anellált nitroxidot (**174**) is szintetizáltak.<sup>57</sup> Intézetünk kutatói a **30** aszimmetrikus paramágneses diénből Diels-Alder reakcióval a **175** biradikális vegyületet állították elő (31. ábra).<sup>22</sup>



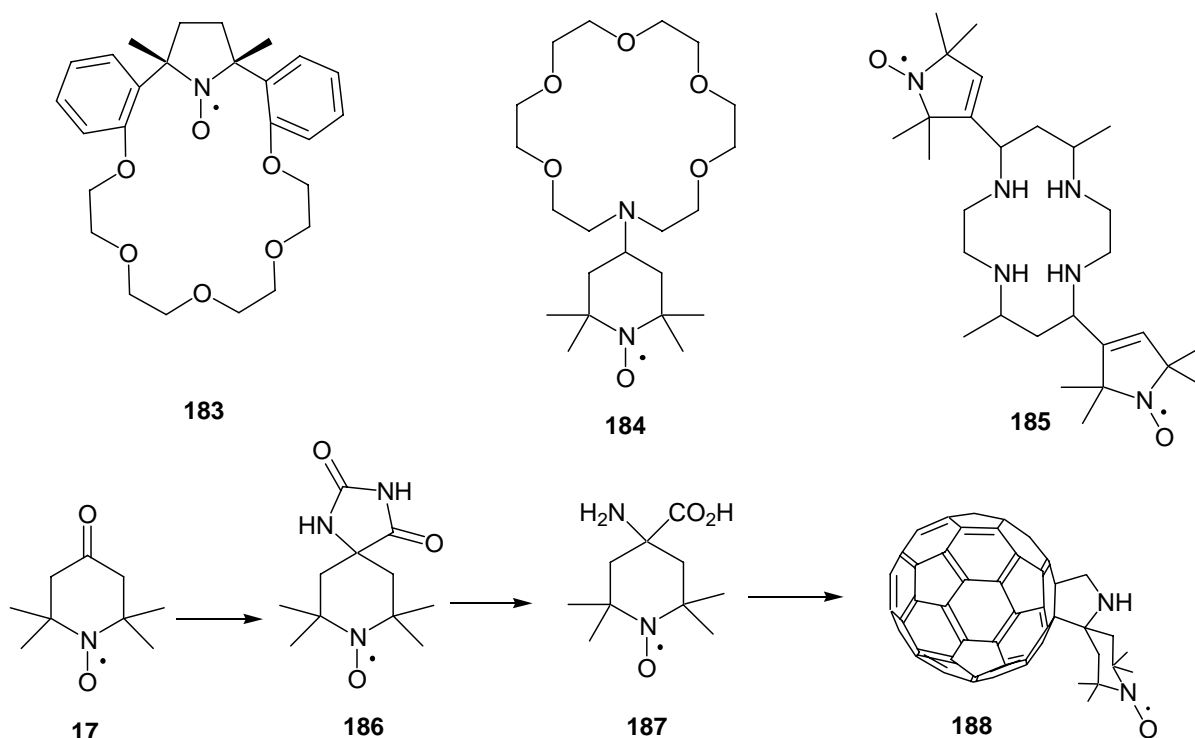
31. ábra: Korábban szintetizált, szénciklusokhoz kapcsolt nitroxidok.

Számos, heterociklushoz kondenzált ill. kapcsolt pirrolin, tetrahidropiridin és piperidin nitroxidot szintetizáltak, bár ezek száma elmarad az egyéb, paramágnesesen módosított vegyületcsaládba tartozó vegyületek számától. Orosz kutatók állították elő a exociklusos kettős kötést tartalmazó **176** keton dimerizációjával keletkező **177** pirano[2,3-c]pirrol biradikális vegyületet,<sup>58</sup> a **178** paramágneses tetrahidrokarbazol analógokat,<sup>59</sup> a **179** epoxidot<sup>60</sup> és a **180** tioféngyűrűt tartalmazó vegyületet.<sup>61</sup> Kínai kutatók **181** paramágneses koronaéter szintézisekor használt 1,5-diol mellékreakciójával a **182** perhidro-2*H*-pirano[3,2-c]piridinvázat tartalmazó vegyülethez jutottak (32. ábra).<sup>62</sup>



32. ábra: Piperidin, tetrahidropiridin, pirrolin és pirrolidin nitroxidokhoz kapcsolt heterociklusok.

Amerikai kutatók és kutatócsoportunk az 1980-as években paramágneses koronaétereket (**183**,<sup>63</sup> **184**<sup>64</sup>) és paramágneses ciklám típusú (**185**) makrociklusokat szintetizáltak.<sup>65</sup> A spirovegyületek közül a **17** ketonból előállítható **186** hidantoin származékot<sup>5</sup> kell említeni, mert ebből nyerhető **187** TOAC aminosav és ebből a fullerénhez kapcsolt **188** spirovegyület (33. ábra).<sup>66</sup>



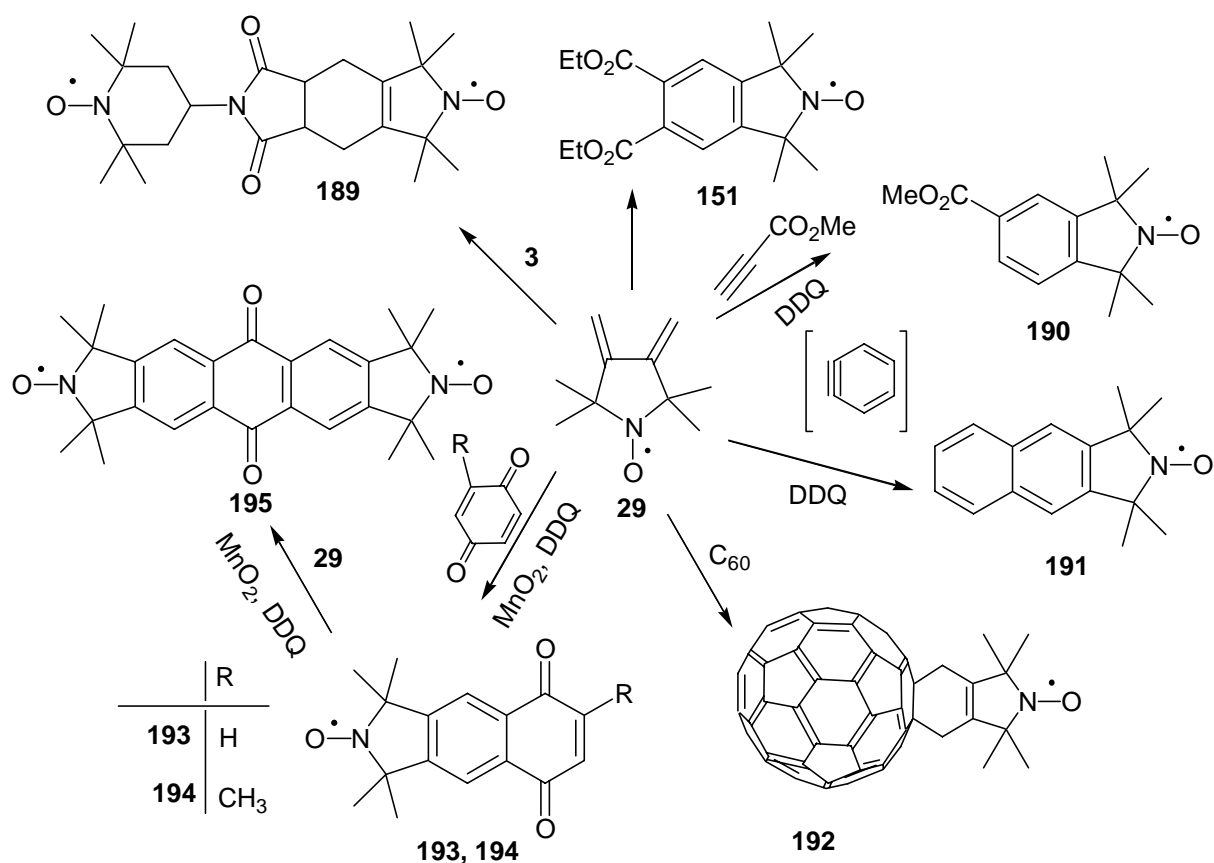
33. ábra: Heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidok.

## 3. 2. Saját eredmények

### 3. 2. 1. Szénciklusokkal anellált pirrolin nitroxidok szintézise

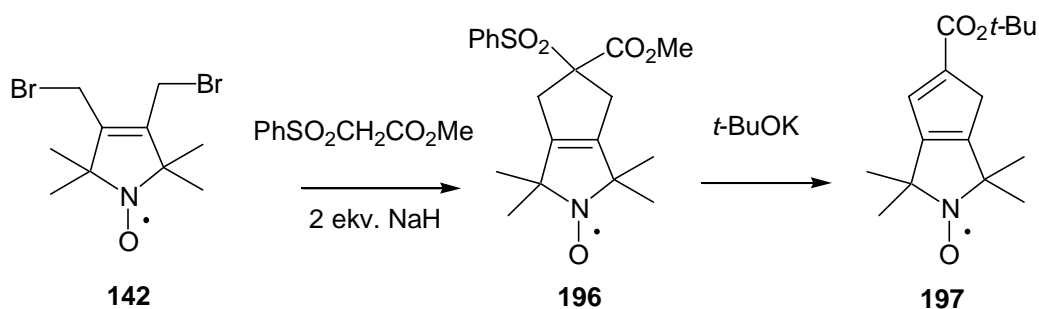
#### A Diels-Alder-reakcióval előállított vegyületek

A **29**<sup>I</sup> szimmetrikus paramágneses diénnel végzett Diels-Alder-reakció a rögzített *cis*-konformáció miatt, a várakozásoknak megfelelően, készségesebben játszódtott le **3** vegyülettel és eredményezte a **189** vegyületet, mint a **3** dienofilvegyület reakciója **30** aszimmetrikus diénnel. A **29** diént acetilén-monokarbonsav- és acetilén-dikarbonsav-észterekkel reagáltatva, majd 2,3-dikór-5,6-diciano-1,4-benzokinonnal (DDQ) oxidálva kaptuk **151** és **190** észtereket 24-33%-os termeléssel.<sup>I</sup> A **29** diént az antranilsavból *in situ* képzett dehidrobenzollal reagáltatva, majd azt követő DDQ-s oxidációval 10%-os termeléssel a **191** paramágneses naftalinhoz jutottunk. A diént a fullerénnel (C<sub>60</sub>) reagáltatva a fullerénekre is jellemző [4+2] addíciós reakcióban<sup>67</sup> a **192** adduktot kaptuk.<sup>XIII</sup> A **29** paramágneses diént 1,4-benzokinonnal vagy metil-1,4-benzokinonnal 2M LiClO<sub>4</sub> oldatban reagáltatva, majd aktív MnO<sub>2</sub>-dal és DDQ-val oxidálva **193**, **194** naftokinonokat kaptuk 27-29%-os termeléssel. A **193** vegyület és a **29** dién ismételt Diels-Alder-reakciójával a **195** biradikális vegyülethez jutottunk (34. ábra).<sup>XIV</sup>



34. ábra: Diels-Alder-reakcióval szintetizált, pirrolin nitroxiddal anellált szenciklusok

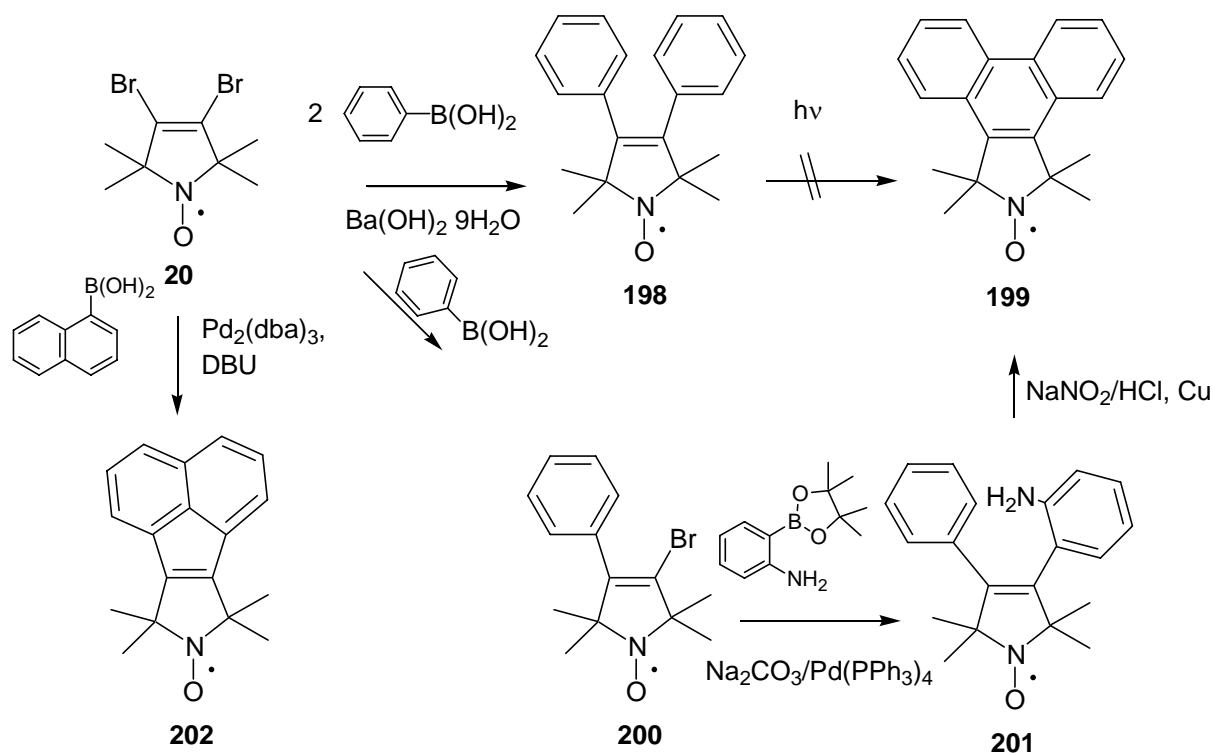
A fenil-szulfonilecetsav-metil-észtert **142** dibrómvegyülettel alkilezve **196** ciklopenténsav-metil-észterre alakítottuk, ebből a fenil-szulfonsavat kihasítva<sup>68</sup> a **197** paramágneses ciklopentadiénhez jutottunk 24%-os termeléssel (35. ábra).<sup>XIII</sup>



35. ábra: Paramágneses ciklopentadién szintézise

### ***Pd-katalizált reakciókkal kialakított paramágneses poliaromás rendszerek***

A pirrolin nitroxiddal anellált poliaromás vegyületek kialakításának egyik lehetséges eszköze a Pd-katalizált keresztkapcsolási reakciók alkalmazása.<sup>69</sup> A **20** dibrómvegyületből Suzuki-reakcióval kapott **198** 3,4-diaril vegyületet fotokémiai reakcióval nem sikerült ciklizálni **199** paramágneses fenantrénné. A lépésenként végrehajtott Suzuki-reakciókon keresztül jutottunk el **201** aromás aminvegyülethez, amit diazotátunk, majd Pschorr-szintézissel<sup>70</sup> alakítottuk ki **199** vegyületet. Érdekesség, hogy tőlünk függetlenül **199** vegyületet ausztrál kutatók is előállították „TMBDIO” néven, amelyet a polipropilén lebomlása közben keletkező gyökök kimutatására használtak, mint fluoreszcens indikátort.<sup>71</sup> A **20** dibrómvegyületet 1-naftilboronsavval reagáltatva  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  katalizátor jelenlétében **202** paramágneses ciklopent[*a*]acenaftilént kaptuk (36. ábra).<sup>IV</sup>



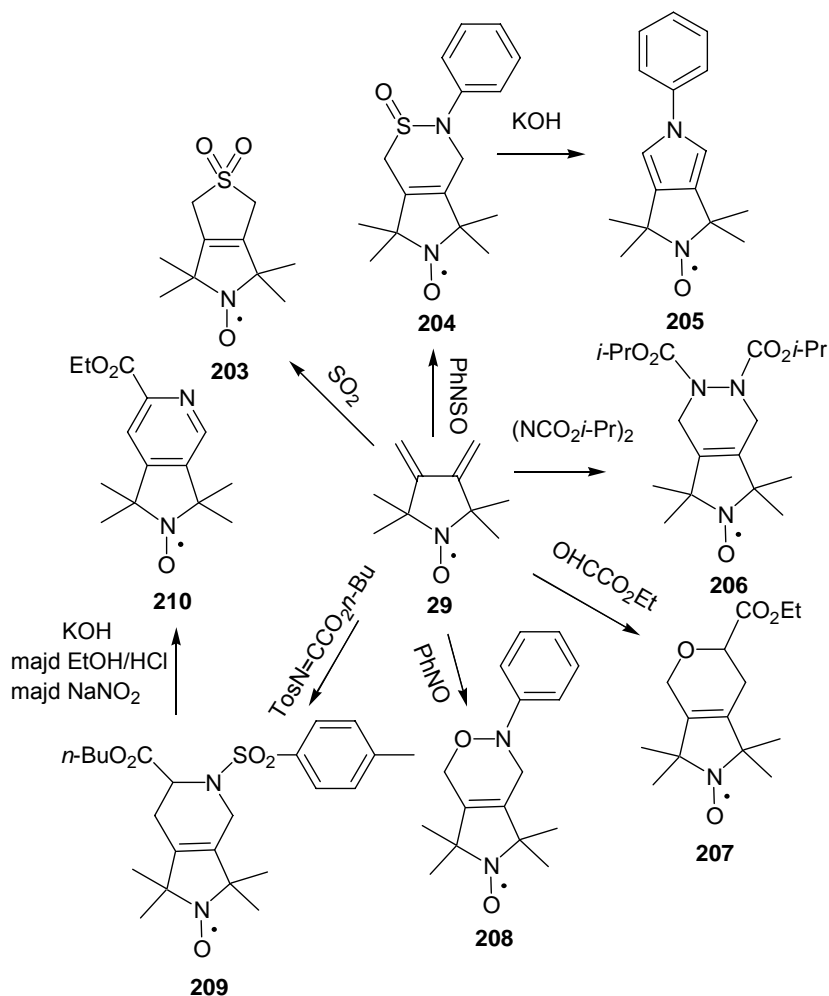
36. ábra: Paramágneses poliaromás vegyületek kialakítása Pd-katalizált reakciókkal.

### **3.2.2. Heterociklusokkal anellált nitroxidok kialakítása**

***A szimmetrikus paramágneses diénből kiinduló szintézisek pirrolin nitroxiddal kondenzált heterociklusok kialakítására***

A **29** diént pirrolin nitroxiddal anellált heterociklusok kialakítására is jól lehet alkalmazni. Keletrop reakció segítségével a **203** gyűrűs szulfonhoz jutottunk,<sup>I</sup> míg hetero Diels-Alder-reakciókban<sup>72</sup> *N*-szulfinil-anilinnel a 6-fenil-2-oxil-1,1,3,3-tetrametil-1,3,4,7-

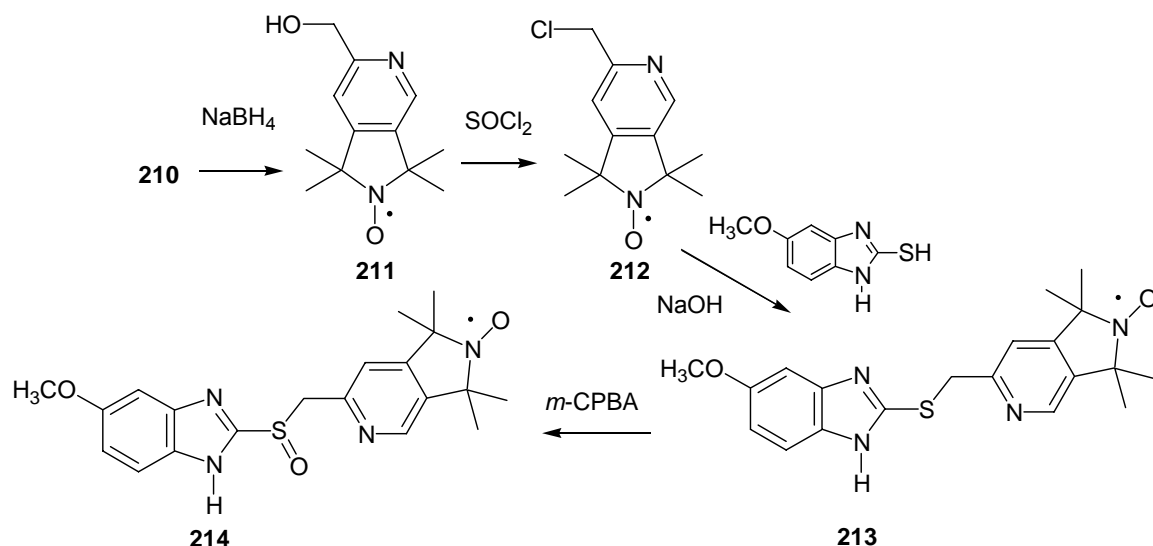
tetrahidro-2*H*-pirrolo[3,4-*d*]6*H*-1,2-tiazin-5-oxidot (**204**) kaptuk, amelyből **205** pirrolo[3,4-*c*]pirrolvázat<sup>I</sup> alakítottuk ki lúgos KOH-dal.<sup>73</sup> A szimmetrikus diént diizopropil-azodikarboxiláttal toluolban melegítve a 2,3-diizopropil-oxikarbonil-6-oxil-5,5,7,7-tetrametil-1,2,3,4,5,7-hexahidro-6*H*-pirrolo[3,4-*d*]piridazin (**206**) vegyületet kaptuk.<sup>I</sup> A **29** diént etil-glioxaláttal 5*M* LiClO<sub>4</sub> éteres oldatban szobahőn reagáltatva 33% termeléssel adta a **207** pirano[3,4-*c*]pirrolvázis vegyületet, addig a nitrozobenzollal kloroformban állni hagyva a **208** pirrolo[2,3-*d*][1,2]oxazinvázis vegyületet kaptuk.<sup>XIII</sup> Az *N*-(butoxi-karbonil-metilén)-*p*-toluolszulfonamidot **29** diénnel reagáltatva a **209** 6-butoxikarbonil-1,3,4,5,6,7-hexahidro-2-oxil-1,1,3,3-tetrametil-5(*p*-toluolszulfonil)-2*H*-pirrolo[3,4-*c*]piridin gyökös vegyülethez jutottunk. Ebből lúgos közegben végzett eliminációval a paramágneses pikolinsavhoz, majd annak Fischer-észterésítésével **210** vegyülethez jutottunk (37. ábra).



37. ábra: Paramágneses heterociklusos vegyületek kialakítása a **29** dién reakcióival.

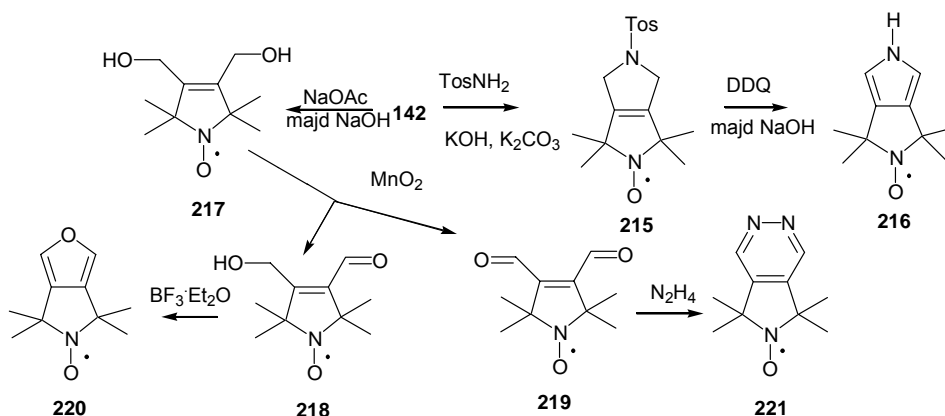


A **210** észtert **211** alkohollá redukáltuk, majd az alkoholt szulfinil-kloriddal **212** paramágneses pikolil-kloriddá alakítottuk, majd ezzel az 5-metoxi-2-merkaptó-benzimidazolt *S*-alkileztük. A **213** szulfidot **214** szulfoxiddá oxidáltuk *m*-klórperbenzoesavval.<sup>XIV</sup> Így a  $H^+/Na^+$  ATP-áz inhibitor, gyomorsavszekréció gátló omeprazol gyógyszer<sup>74</sup> paramágneses analógját állítottuk elő. Ennek a vegyületnek a savszekréció gátlás mellett jelentős antioxidáns hatása is van (38. ábra).



38. ábra: A paramágneses omeprazol analóg előállítása

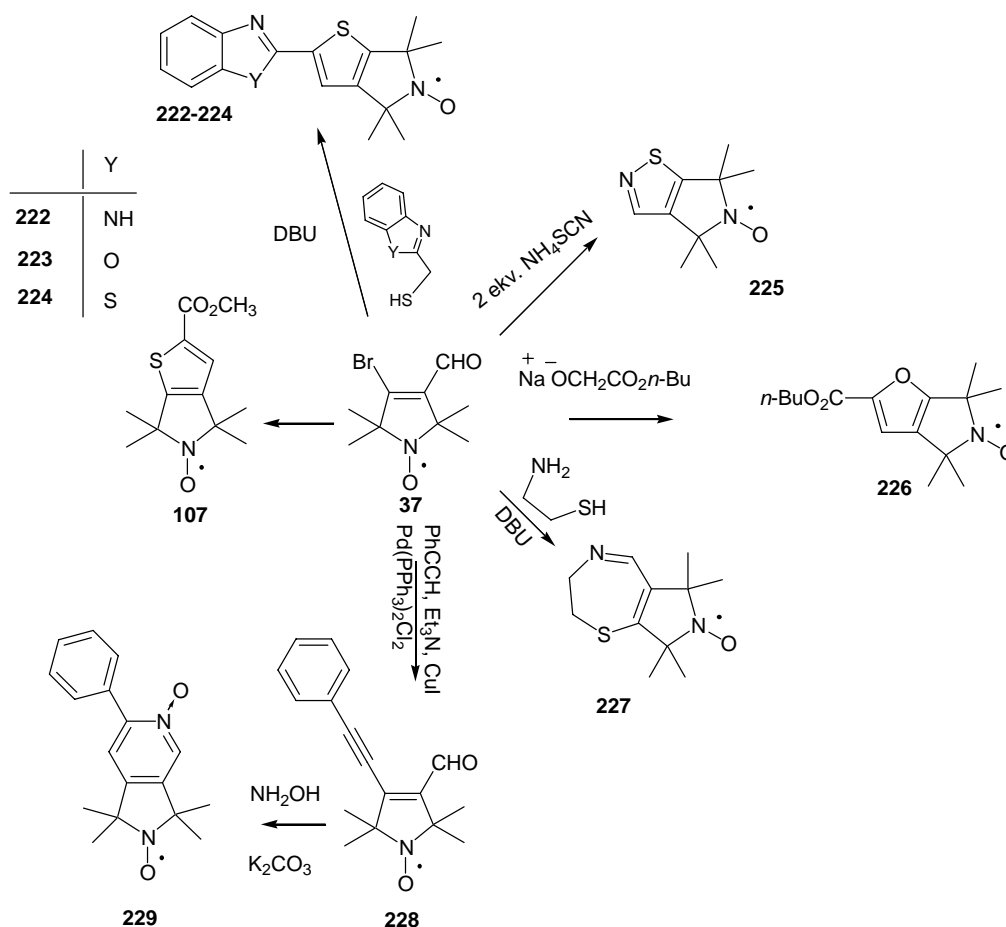
A szimmetrikus paramágneses diénből készíthető **142** dibrómvegyülettel a toluolszulfonsavamidot alkilezve, majd **215** vegyületet DDQ-val aromatiszálva és a képződő tozilcsoportot hidrolizálva jutottunk a pirrolo[3,4-*c*]pirrolvázis **216** vegyülethez. A **142** dibrómot nátrium-acetáttal reagáltatva, majd az észterek elszappanosításával jutottunk a **217** bisz(3,4-hidroximetil)pirrolin nitroxidhoz. Ezt  $MnO_2$ -dal szobahőn oxidálva a **218** monoformil és **219** diformil nitroxidot kaptuk. Előbbit  $BF_3 \cdot Et_2O$ -tal (1,2-szeres mennyiség) furángyűrűvel anellált pirrolin nitroxiddá (**220**) alakítottuk.<sup>XIV</sup> A **219** dialehidet hidrazinnal a **221** piridazinná ciklizáltuk<sup>I</sup> (39. ábra).



39. ábra: Pirrolin nitroxiddal kondenzált heterociklusok szintézise **142** dibrómvegyületből.

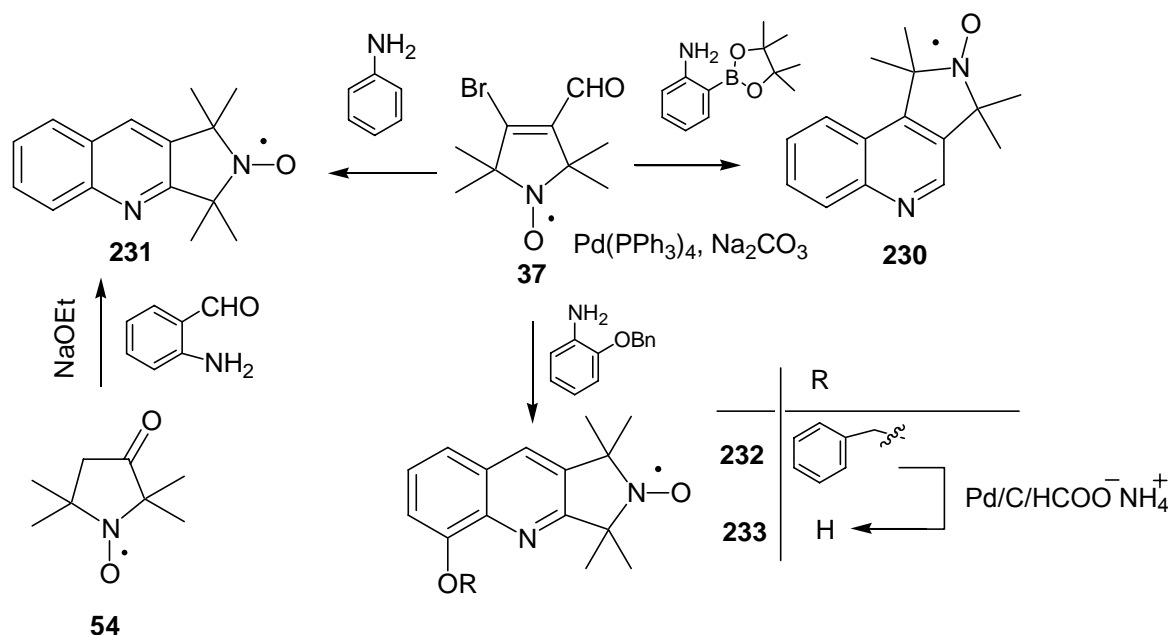
### Paramágneses $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen-aldehidek, -nitrilek, -észterek gyűrűzárási reakciói

A  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen-aldehidek számos reakciója ismert,<sup>75</sup> mert az ilyen vegyületek  $\alpha$ -metilén ketonok Vilsmeier-Haack-reakciójával is előállíthatók.<sup>76</sup> A **37** aldehidet metiltioglikoláttal reagáltatva Fiesselmann-reakcióban a **107** tiofénnel kondenzált pirrolin nitroxidot kaptuk (ld. 2. fejezet).<sup>II</sup> A 2-merkaptometil-benzazolokkal **222-224** vegyületekhez jutottunk 35-68%-os termeléssel.<sup>XIII</sup> Az intézetünk korábbi munkáiban a 2-merkaptometil-benzimidazolt (**222**)  $\alpha,\beta$ -acetilén-ketonokkal reagáltatva 2'-tienil-2-benzimidazolokat kaptunk.<sup>77,78</sup> Ezt a reakciót kiterjesztettük diamágneses 2'-tienil-2-benzoxazol-származékok és benzthiazol-származékok előállítására is.<sup>79</sup> A **37** vegyületet 2 ekvivalens ammónium-tiocianáttal reagáltatva<sup>80</sup> **225** izotiazollal anellált pirrolin nitroxidot kaptuk, míg butil-glikolát nátriumsójával reagáltatva gyenge termeléssel (12%) **226** furánvegyülethez jutottunk.<sup>XIII</sup> A **37** aldehidet ciszteaminnal reagáltatva DBU feleslegében a **227** 7-oxil-6,6,8,8-tetrametil-2,3,6,8-tetrahidro-7H-pirrolo[3,4-f]-1,4-tiazepint kaptuk.<sup>II</sup> A **37** brómaldehid Sonogashira-reakcióban fenil-acetilénnel a **228** vegyületet adta. Az ebből képzett aldoxim spontán gyűrűzárással a **229** 2-fenil-piridin-1-oxiddal kondenzált heterociklusos vegyületet eredményezte (40. ábra).



40. ábra: Pirrolin nitroxiddal kondenzált heterociklusok szintézise **37** aldehidből

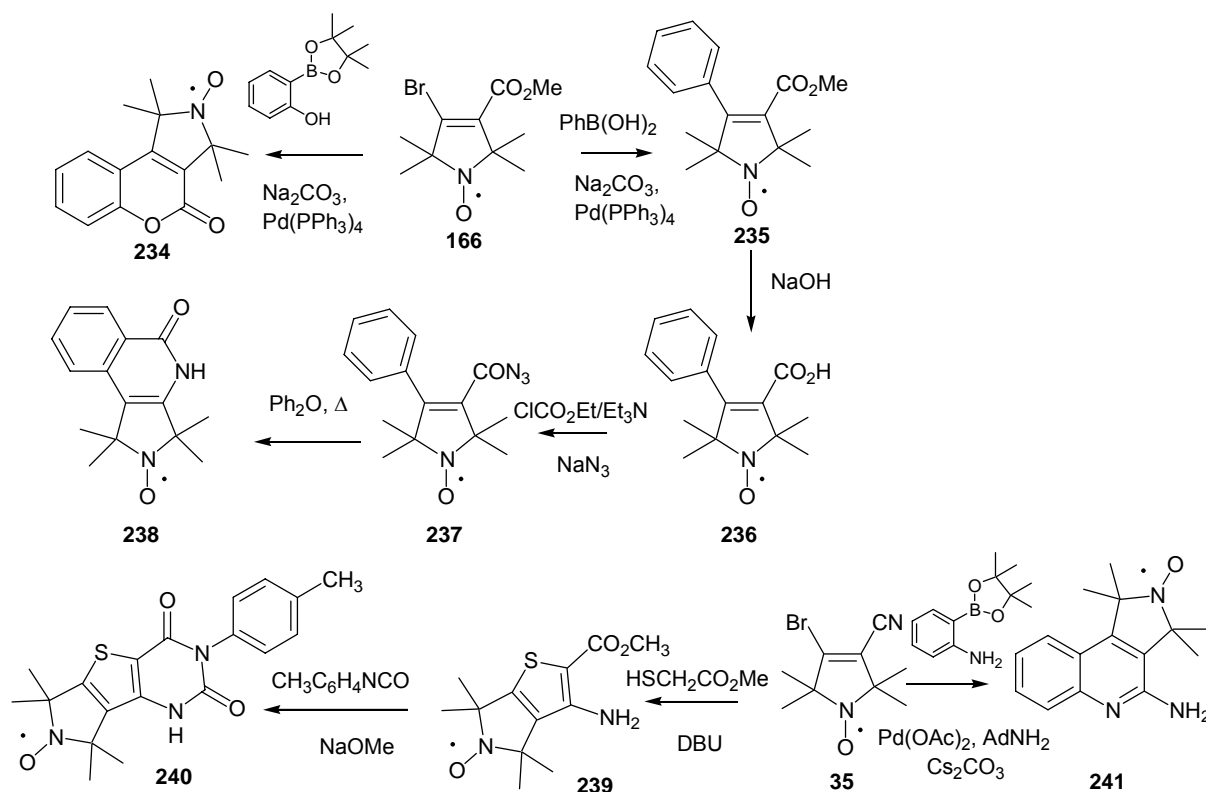
A **37** aldehidet a 2-amino-fenil-boronsav-észterrel reagáltatva Suzuki-reakcióban **230** angulárisan kondenzált vegyületet kaptuk. A **37** aldehidet anilinnel reagáltatva *N,N*-dimetil-formamidban (DMF), a lineárisan kondenzált **231** vegyülethez jutottunk.<sup>IV</sup> Ez utóbbi reakció kiterjeszthető volt az anilin alkiloxiszármazékaira is. Így **232** 2,3,8-triszubsztituált kinolinból, a benzilcsoport eltávolítása után a **233** komplexképző paramágneses 8-hidroxi-kinolin analógot kaptuk. Azt tapasztaltuk, hogy ez a reakció<sup>81</sup> dezaktiváló csoportot (nitro, karboxil, halogén stb.) tartalmazó anilinszármazékokkal nem, vagy igen gyenge (1-3%) termeléssel játszódott le. Az **54** keton és a 2-amino-benzaldehid Friedländer-reakcióval<sup>82</sup> a **231** lineárisan kondenzált vegyületté volt alakítható (41. ábra).<sup>V</sup>



41. ábra: Paramágneses kinolinok szintézise **37** aldehidből.

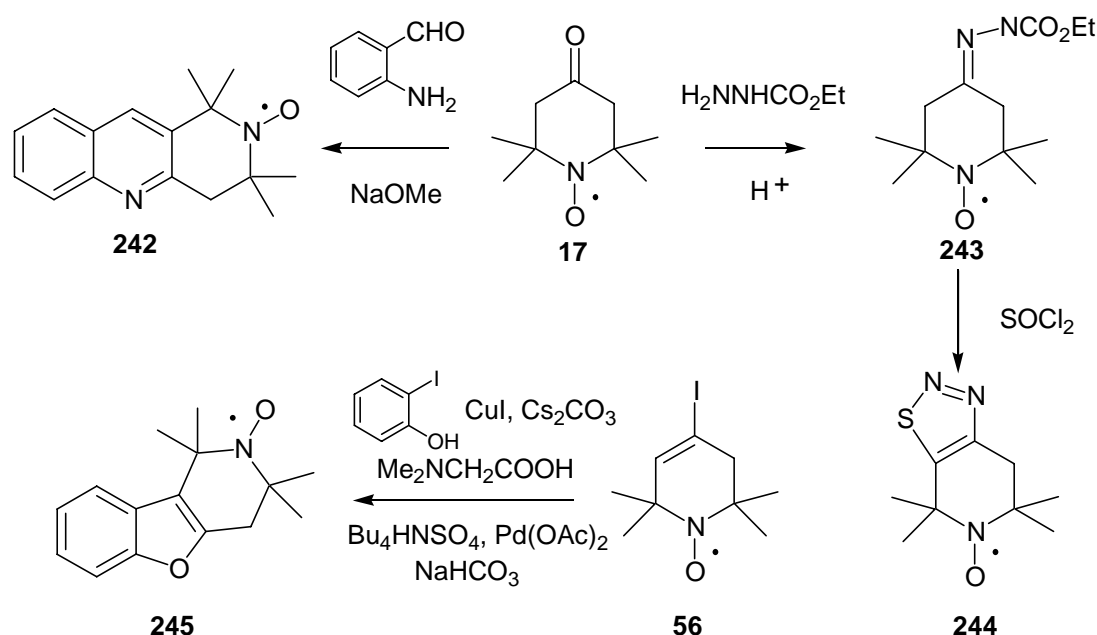
A **166**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen észtert a 2-hidroxi-fenil-boronsav-észterrel reagáltatva Suzuki-kapcsolási reakcióban, majd báziskatalizált átésztereződéssel **234** kumarinhoz kondenzált pirrolin nitroxiddá alakítottuk.<sup>IV</sup> A **166** észterből előállítottuk Suzuki-reakcióval a 4-fenilszármazékot (**235**). Ezt az észtert savvá hidrolizáltuk, a savból képzett vegyesanhidrid-észtert  $\text{NaN}_3$  acetonos-vizes oldatában **237** savaziddá alakítottuk. A savazidot difeniléterben melegítve, a Curtius-átrendeződést követő Friedel-Crafts reakció a **238** pirrolo[3,4-*c*]izokinolin-5-on vegyületté zárt.<sup>III</sup> A **35**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen-nitrilt bázis jelenlétében metil-tioglikoláttal reagáltatva **239** 3-amino-2-metoxikarbonil-5-oxil-4,4,6,6-tetrametil-4,6-dihidro-5*H*-thieno[2,3-*c*]pirrol vegyületet kaptuk. Ebből 4-tolil-izocianáttal 26%-os hozammal állítottuk elő a **240** triciklusos vegyületet.<sup>XIII</sup> Míg a **37** aldehidből a 2-es helyzetben

nem szubsztituált, angulárisan kondenzált kinolin keletkezett, addig a **35** nitrilből ugyanezzel a boronsavval a továbbalakításra alkalmas **241** paramágneses 2-amino-kinolinhoz vezetett a Pd-katalizált reakció. (42. ábra).<sup>IV</sup>



42. ábra: Anellált pirrolin nitroxidok szintézise  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen telítetlen észterekből és nitrilekből

A hattagú heterociklusos vegyületekből ez ideig nem sikerült kialakítanunk *s-cisz* rögzített konformációjú diént és a megfelelő  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen-aldehydet. Így a kondenzált származékok szintézisének kiindulási anyagaiként a **17** ketonra és **56** jódvegyületre szorítkoztunk. A **17** ketonból a Friedländer-reakció **242** kinolinszármazékot adta, míg az etil-karbazáttal kapott hidrazonszármazék szulfinil-kloridos gyűrűzárási reakciója<sup>83</sup> 27%-os összhozammal a tiadiazolhoz kondenzált hattagú nitroxidhoz (**244**) vezetett. Az **56** vinil-jodidot 2-jódfenollal reagáltatva egy keresztkapcsolási, majd az azt követő Heck-reakcióval<sup>84</sup> **245** benzofuránnal kondenzált hattagú nitroxid képződött (43. ábra).<sup>V</sup>

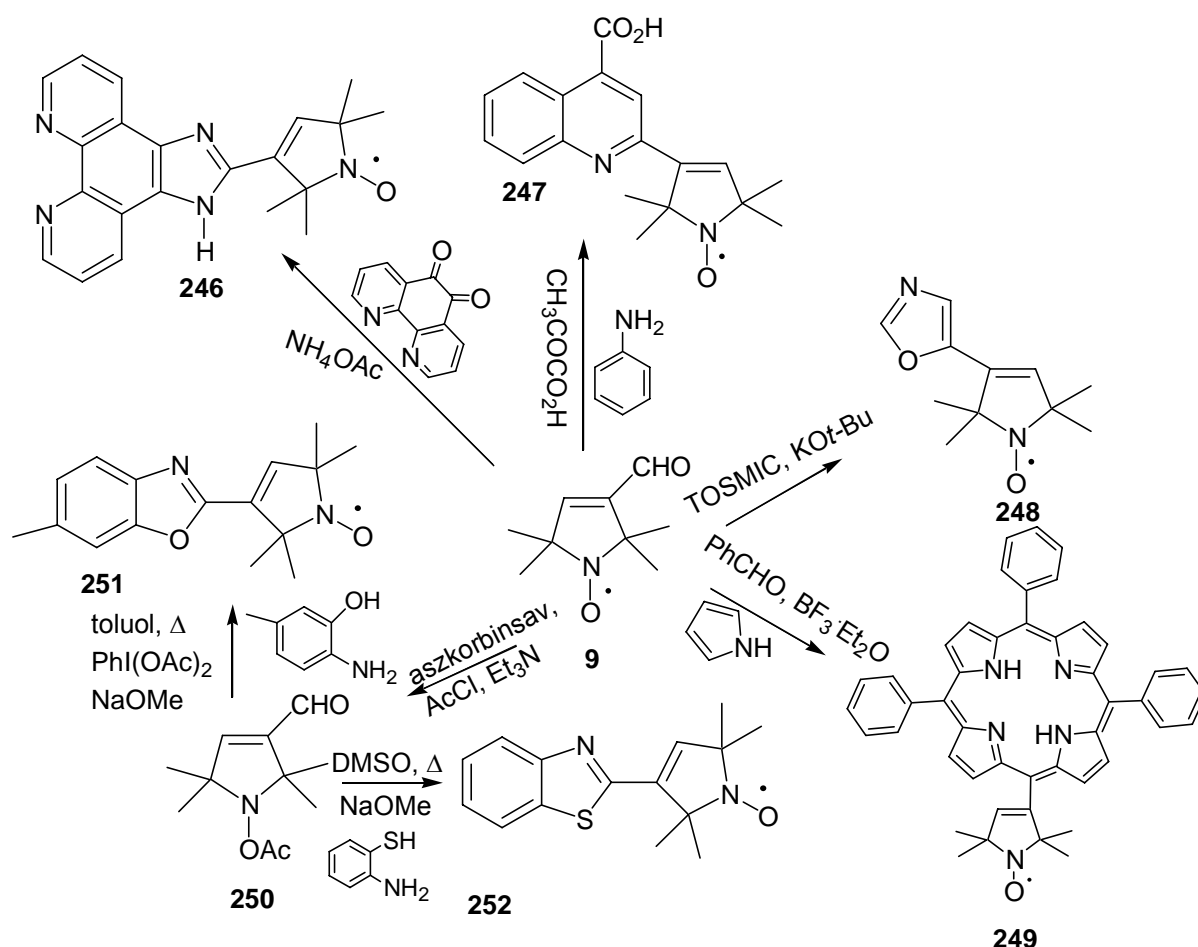


43. ábra: Hattagú nitroxidokkal anellált heterociklusok szintézise

### 3.2.3. A nitroxidokhoz $\sigma$ -kötésen keresztül kapcsolt heterociklusos vegyületek szintézise

A paramágneses pirrolin és tetrahidropiridin gyűrűvel szubsztituált heterociklusokat legegyszerűbben **9** és **14** paramágneses aldehidekből, valamint a **7** és **12** savakból képzett savkloriddal lehetett kialakítani. A **9** aldehiddel számos klasszikus gyűrűzárási reakciót sikerült megvalósítanunk: 1,10-fenantrolin-5,6-dionnal és ammónium-acetáttal reagáltatva **246** vegyülethez vezetett.<sup>XIII</sup> Anilinnel és piroszőlősavval végzett Doebner-szintézissel<sup>85</sup> **247** paramágneses kinolin-4-karbonsavat kaptunk. Kálium-tercier-butilát jelenlétében TOSMIC-kal reagáltatva **248** paramágneses oxazolhoz jutottunk.<sup>86</sup> A **9** aldehidet 4 ekvivalens pirrollal és 3 ekvivalens benzaldehiddel reagáltatva BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O katalizálta reakcióban, majd DDQ-val oxidálva a **249** porfirinszármazékot eredményezte 3%-os termeléssel, főtermékként az 5,10,15,20-tetrafenil-porfirin képződött.<sup>87</sup> A 2-szubsztituált benzazolszármazékokat szintén **9** aldehid *O*-acetátszármazékából (**250**) szintetizáltuk. Az 5-metil-2-aminofenolt **250** vegyülettel kondenzáltattuk, majd a kapott nyers Schiff-bázis PhI(OAc)<sub>2</sub>-os oxidációjával<sup>88</sup> és a védőcsoport eltávolítása után jutottunk **251** paramágneses benzoxazolhoz. A **250** vegyületet 2-amino-tiofenollal DMSO-ban melegítve, azt követően a védőcsoportot eltávolítva kaptuk **252** 2-szubsztituált benzthiazolt (44. ábra).<sup>V</sup> A védőcsoport használatára azért volt szükség, mert a PhI(OAc)<sub>2</sub> vegyület a nitroxidot oxoimmóniummá oxidálja, míg az aromás tiol

hosszabb melegítés hatására *N*-hidroxilaminná redukálja aromás diszulfid keletkezése közben és nehezen feldolgozható reakcióelegyet eredményezne.



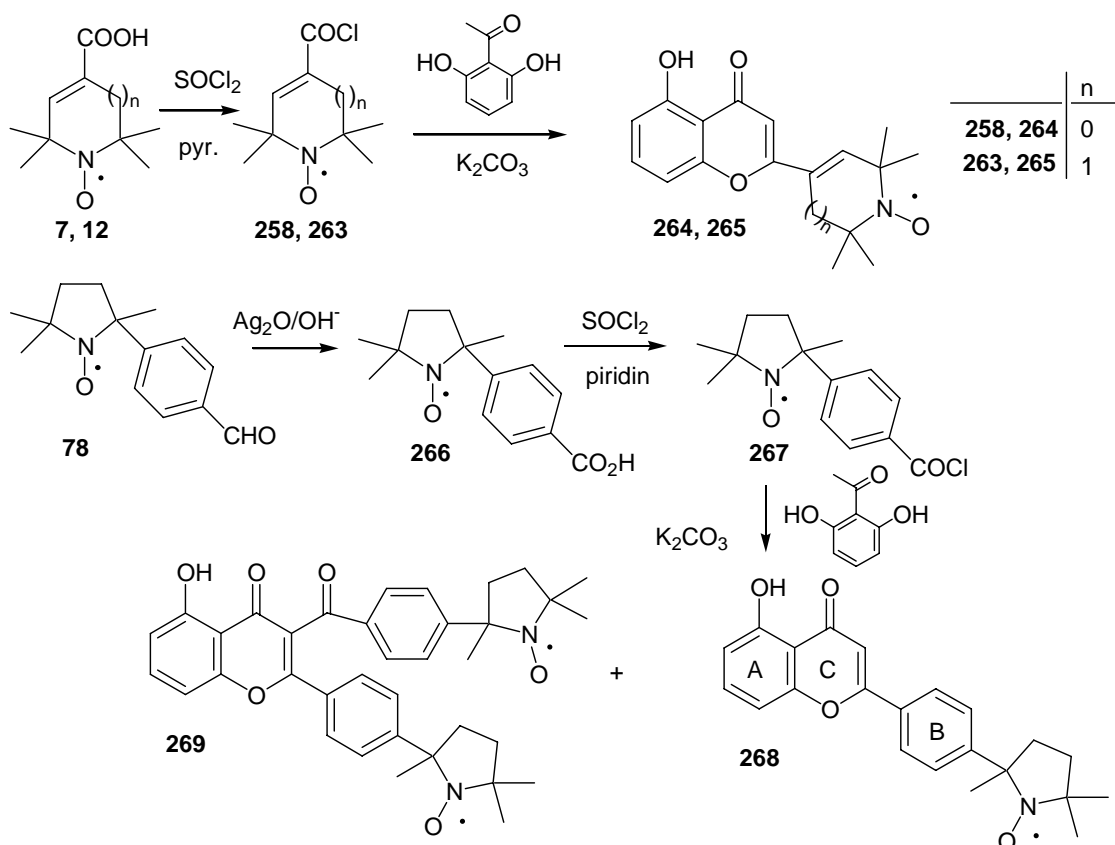
44. ábra: Heterociklusokhoz C-C kötéssel kapcsolt nitroxidok „klasszikus” szintézisei

A heterociklushoz kapcsolt nitroxidok egyik igen fontos csoportját képezik a hattagú, egy oxigénatomot tartalmazó heterociklushoz kapcsolt származékok, a nitroxidgyűrűvel módosított kromonok és a flavonoidok. Ezeket főleg antioxidáns hatás-szerkezet vizsgálatok céljából szintetizáltuk. A **9** aldehiddől 2-hidroxi-acetofenonnal aldolkondenzációban kapott  $\alpha,\beta$ -telítetlen ketont (**253**) ecetsavban főzve 2-szubsztituált kromanon (**254**) keletkezett.<sup>89</sup> A gyűrűzárást lúgos közegben hidrogén-peroxiddal szobahőfokon végezve 3 órás reakcióban 22%-os hozammal a 2-es helyzetben szubsztituált 3-hidroxi-kromanont (**255**) nyertük. Ez a reakció más körülmények között (0 °C, 1 napos állás) a pirrolin nitroxidgyűrűvel 2-es helyzetben szubsztituált-3-hidroxi-kromont (**256**) 26%-os termeléssel adta.<sup>XV</sup> A flavont 3-as helyzetben lítiálva, majd **9** aldehiddel reagáltatva a **257** paramágnesesen módosított flavont képződött 52%-os termeléssel.<sup>XVI</sup>

The reaction scheme illustrates the synthesis of compound 261 from intermediate 9. The scheme includes the following steps and intermediates:

- 9** (a 2,2,6,6-tetramethyl-1-oxo-1H-pyrrole-3-carbaldehyde derivative) reacts with **flavon** and **LDA** to form **257**.
- 9** reacts with **NaOH** and **AcOH** to form **254**.
- 9** reacts with **NaOH** and **AcOH** to form **253**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **256**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **255**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **262**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **258**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **259**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **260**.
- 9** reacts with **NaOH** and **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** to form **261**.

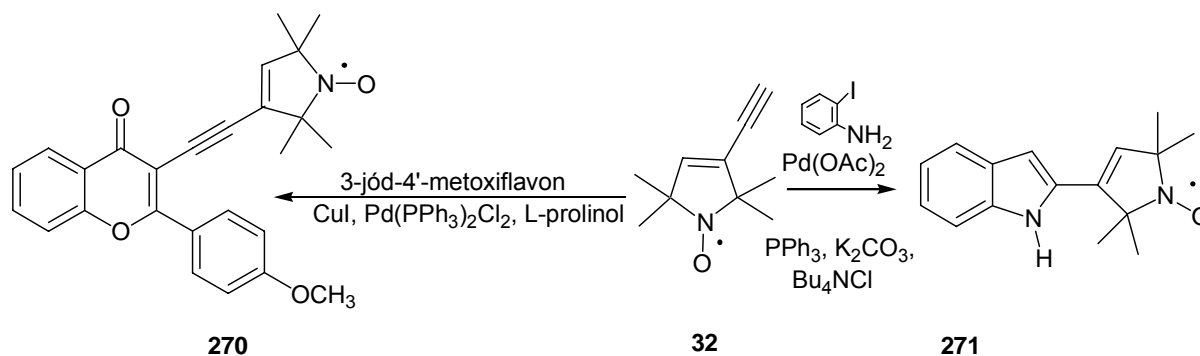
A fenti flavonszintézis 2,6-dihidroxi-acetofenonból és savkloridból kiindulva egylombikos reakcióban is végrehajtható.<sup>91</sup> A **12** savból szulfinil-kloriddal a **263** savkloridot állítottuk elő. A **258** és **263** savkloridokat a 2,6-dihidroxi-acetofenonnal reagáltatva K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ötszörös feleslegével acetonban a **264** és **265** 2-szubsztituált-5-hidroxi-kromont kaptuk 12-17%-os hozammal. A **78** paramágneses benzaldehidet ezüst-oxiddal **266** karbonsavvá oxidáltuk, majd a savat szulfinil-kloriddal **267** paramágneses benzoil-kloriddá alakítottuk. A **267** savklorid 2,6-dihidroxi-acetofenonnal egylombikos reakcióban 15%-os hozammal adta a **268** B-gyűrűn paramágnesesen módosított 5-hidroxi-flavonszármazékot és melléktermékként a **269** biradikális vegyületet (46. ábra).<sup>XV,XVI</sup> Az így előállított flavonszármazékok antioxidáns hatásosságát (gyökfogó képességét) *in vitro* körülmények között vizsgáltuk<sup>92</sup> és azt tapasztaltuk, hogy általában az alap (szubsztituátatlan) flavonhoz képest jobb, de nem éri el a több hidroxilcsoportot tartalmazó kvercetin hatékonyságát.



46. ábra: Paramágneses 5-hidroxi-flavonok „egylombikos” szintézise

Pd-katalizált keresztkapcsolási reakciók öt és hattagú gyűrűvel szubsztituált heterociklusok előállítására

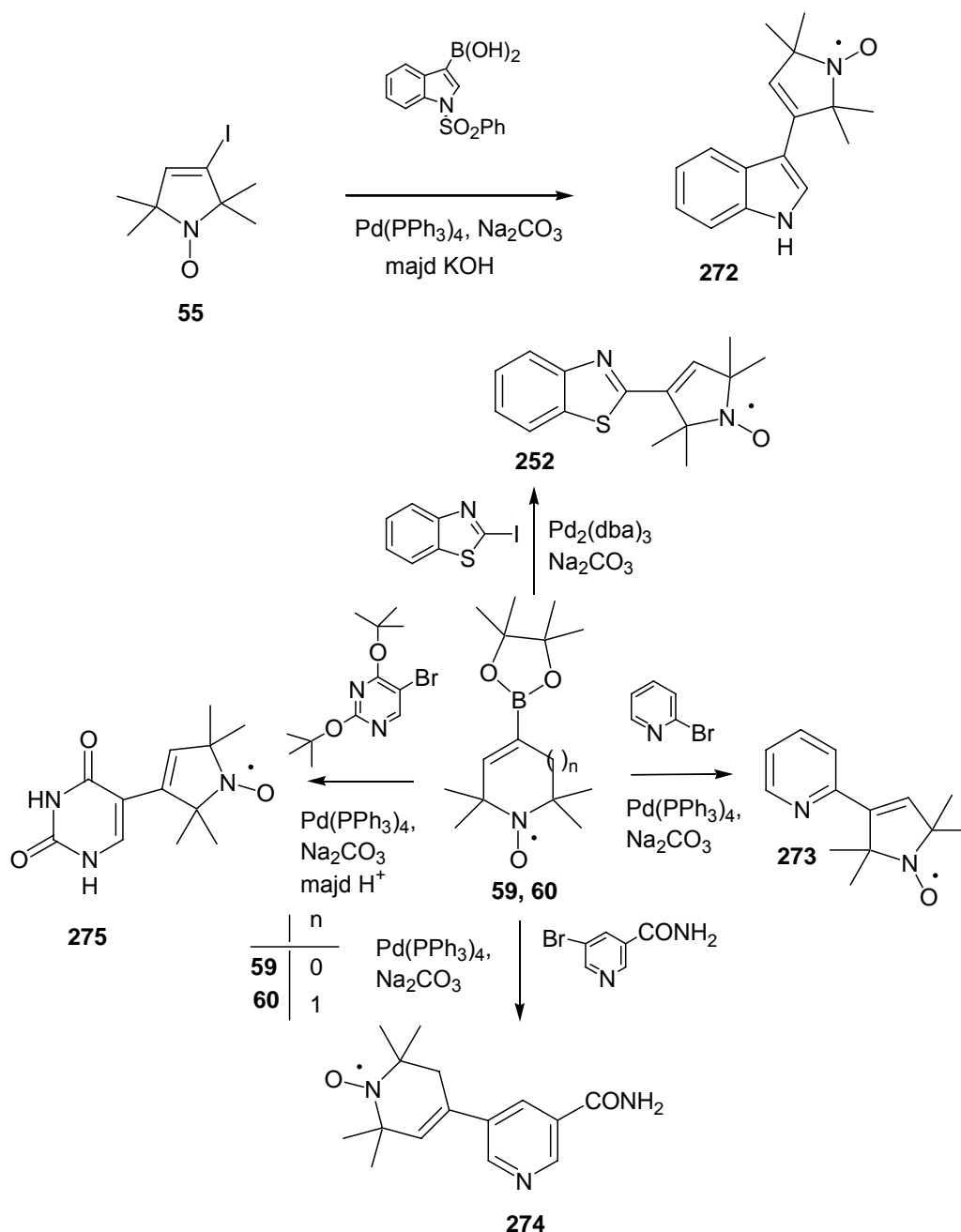
A nitroxidokkal módosított heterociklusok szintézisére általánosan használhatók a Pd-katalizált keresztkapcsolási reakciók, mert a nitroxidcsoport a reakcióban nem módosul. Ezekhez a reakciókhoz az előző fejezetben ismertetett nitroxidvegyületek, az **59**, **60** boronsavak, az **55**, **56** jódvegyületek és a **32** acetilénvegyület szolgáltak kiindulási vegyületeként. A **32** vegyületet 3-jód-flavonnal reagáltatva a Sonogashira-reakció<sup>93</sup> körülményei között (CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> és L-prolinol) a **270** vegyületet kaptuk,<sup>XVI</sup> **32** vegyületet 2-jód-anilinnel a Larock-indolszintézis<sup>94</sup> körülményei között **271** 2-szubsztituált indollá zárt gyűrűt (47. ábra).<sup>III</sup>



47. ábra: Paramágneses heterociklusos vegyületek előállítása a **32** acetilénvegyületből



A nitroxiddal 3-as helyzetben szubsztituált indolt (**272**) az *N*-fenil-szulfonil-indol-3-boronsavból<sup>95</sup> és **55** jódvegyületből állítottuk elő Suzuki-reakcióval.<sup>V</sup> A paramágneses boronsavak (**59**, **60**) Suzuki-reakcióban akkor különösen jelentősek, ha csak a heterociklusos halogénvegyület áll rendelkezésre, a boronsav nem. Így sikerült előállítanunk a korábban már klasszikus szintézissel előállított **252** benzthiazolt 2-jódbenzthiazolból,<sup>V</sup> a paramágneses **273** 2-piridinszármazékot 2-brómpiridinből,<sup>VI</sup> a **274** paramágneses nikotinsavamidot az 5-brómnikotinsavamidból<sup>IV</sup> és a **275** paramágneses uracilt<sup>VI</sup> az 5-bróm-2,6-ditercierbutoxi-pirimidinből.<sup>96,97</sup> (48. ábra).



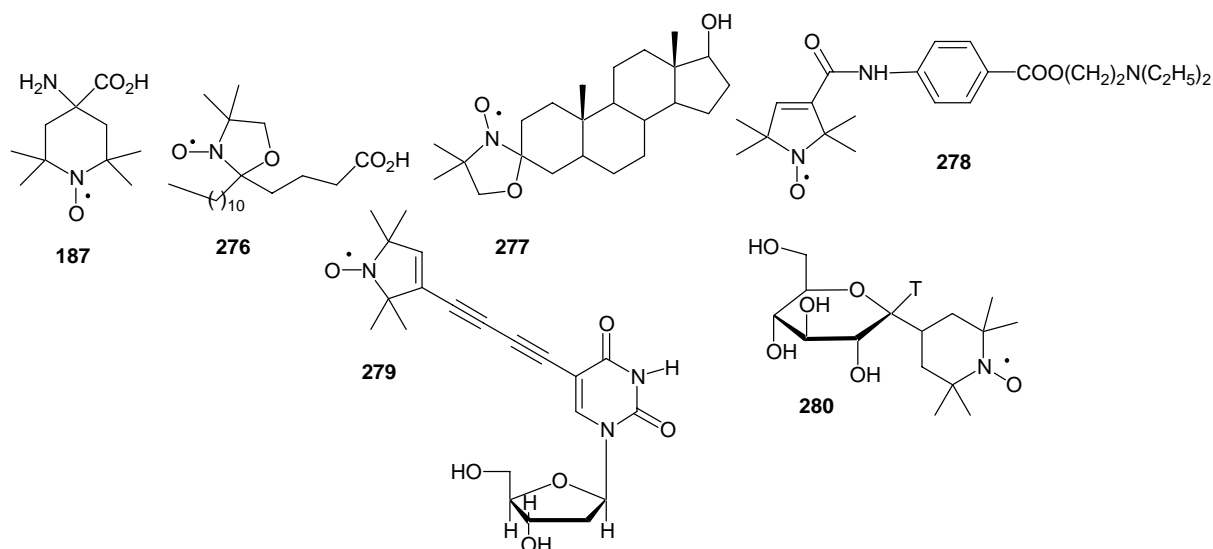
48. ábra: Paramágnesesen módosított heterociklusok szintézise Suzuki-reakcióval

#### 4. Paramágnesesen módosított biológiailag aktív vegyületek és redukált származékaik szintézise

A nitroxidokkal történő spinjelzés elterjedése mellett igen fontos volt az a felismerés, hogy nemcsak a makromolekulát lehet paramágnesesen módosítani (pl. alkilezni, acilezni), hanem egy összetettebb biológiai rendszer valamely építőkövét is lehet módosítani, pl. egy adott enzim szubsztrátját, vagy a membránt felépítő zsírsavat, vagy a fehérjét felépítő aminosavat. Az ilyen rendszerek ESR spektroszkópiás vizsgálata szintén hasznos információt szolgáltat a vizsgált biológiai rendszer szerkezetéről és funkciójáról. A másik fontos felismerés, hogy a nitroxidok párosítatlan elektronjuk révén be tudnak kapcsolódni az élőszervezetekben lejátszódó redox folyamatokba pl. szuperoxid diszmutálás, reaktív oxigénszármazékok csapdázása. Ez a fejezet a paramágnesesen módosított kismolekulák szintézisét, néhány vegyület antioxidáns hatás-szerkezet összefüggését és biofizikai vizsgálatát tárgyalja.

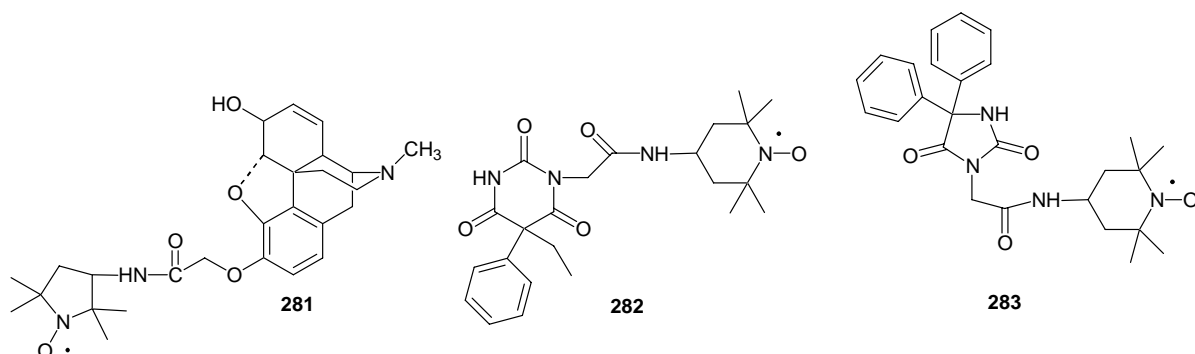
##### 4.1. Irodalmi háttér

Az első nitroxidokkal módosított biológiailag aktív molekulák közé tartozik a már említett **187** TOAC (aminosav) vagy a **276** paramágneses doxil zsírsav és **277** szteroidszármazék, amelyet Hubbell és McConnell a kettős lipid membrán tanulmányozására használtak.<sup>3</sup> Hideg és munkatársai a helyi érzéstelenítő spinjelölt prokaint **278** állították elő,<sup>98</sup> amelynek megoszlási koefficiensét dimirisztin-foszfatidil-kolin kettős membrán modellen is vizsgálták.<sup>99</sup> Hopkins csoportja paramágnesesen módosított timidint (**279**) épített be dezoxi-oligonukleotidba.<sup>100</sup> Számos paramágnesesen módosított szénhidrátszármazékot (mint pl. **280** glükóz-származék) szintetizáltak enzimek aktív helyének tanulmányozására (49. ábra)<sup>101, 102</sup>



49. ábra: Paramágnesesen módosított biomolekulák

Az 1970-es években számos, központi idegrendszerre ható vegyület, pl. kodein ill. morfin<sup>103</sup> (**281**), barbitursav (**282**), dilantin (**283**)<sup>104</sup> spinjelölt származékát, mint paramágneses antigéneket szintetizáltak. Ezekhez antitesteket termeltettek, majd az ezekhez kötődő paramágneses molekulákat a megfelelő alapvegyületekkel szorították ki a kötődés helyéről. A folyamat ESR spektroszkópiával követhető volt. Ezzel az un. „spin immunoassay” technikával a kérdéses vegyületek akár  $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M koncentrációban is kimutathatók voltak nem transzparens biológiai mintákban (50. ábra).<sup>105</sup>

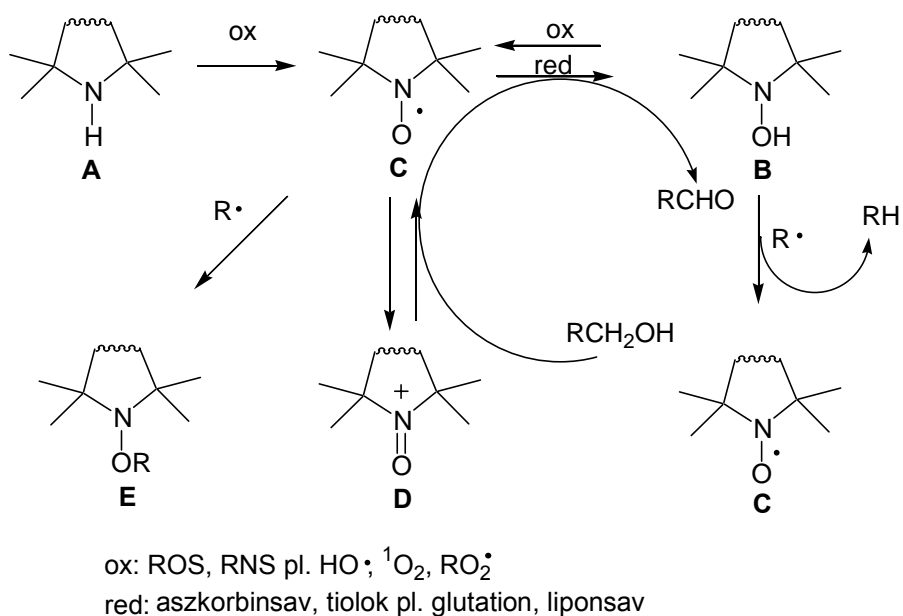


50. ábra: Spinjelölt haptének „spin immunoassay” vizsgálatokhoz

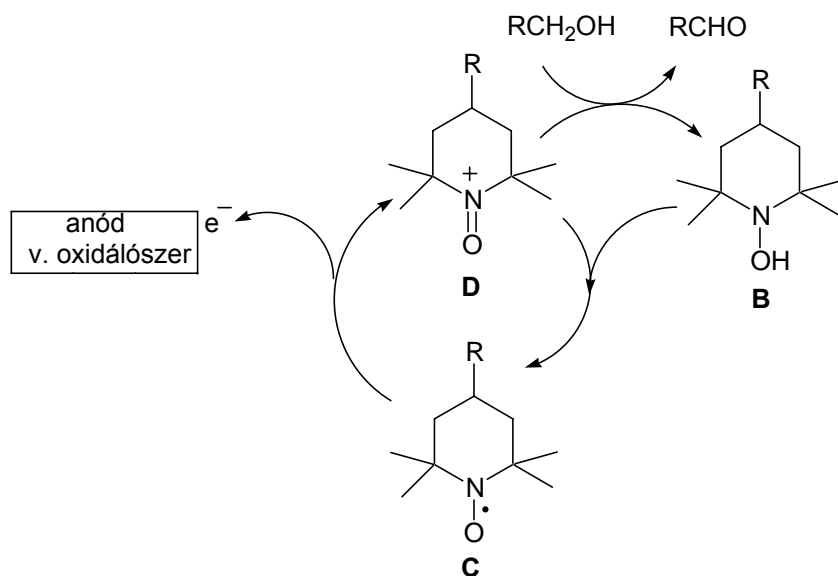
A nitroxidok biológiai alkalmazása kapcsán több kutatócsoport is vizsgálta a nitroxidok lehetséges metabolitjait, toxicitását, farmakokinetikai jellemzőit.<sup>106-108</sup>

Intézetünk munkatársai az NIH kutatóival (Bethesda) együttműködésben bizonyították, hogy a reaktív oxigénszármazékok (ROS) a sztérikusan gátolt amint („A forma”) stabilis szabad gyökké („C forma”) oxidálják.<sup>109</sup> Ez a stabilis szabad gyök azonban a sejtekben lévő aszkorbát, tiolok, stb. hatására *N*-hidroxilaminná („B forma”) redukálódik,<sup>110</sup> ugyanakkor azt is tapasztalták, hogy az *N*-hidroxilaminok enzimatikusan nitroxidokká oxidálódnak vissza.<sup>111</sup>

A nitroxidok tovább oxidálódhatnak diamágneses oxoimmóniummá („D forma”) vagy rekombinálódhatnak pl. alkilgyökökkel *O*-alkil-hidroxilamint („E forma”) képezve. Ezt a reakciót hidroxilgyökök közvetett kimutatására is használják.<sup>112</sup> A hidroxilaminok redukáló hatásuk révén képesek redukálni a káros szabad gyökös vegyületeket, miközben ők maguk a nem toxikus stabilis nitroxid szabad gyökké („C forma”) alakulnak (51. ábra). Az oxoimmóniumion - nitroxid - hidroxilamin („D-C-B forma”) rendszer a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redox rendszerre emlékeztető sajátosságokkal rendelkezik. Ezt a reakciót a preparatív szerves kémiában is használják, bár az oxidációhoz egy másik oxidálószer (pl. hipoklorit, elemi bróm, elemi klór, *N*-bróm-szukcinimid stb.) vagy anódos oxidáció is szükséges, ha a folyamat a nitroxidra ill. oxoimmóniumionra nézve katalitikus (52. ábra).<sup>113</sup>



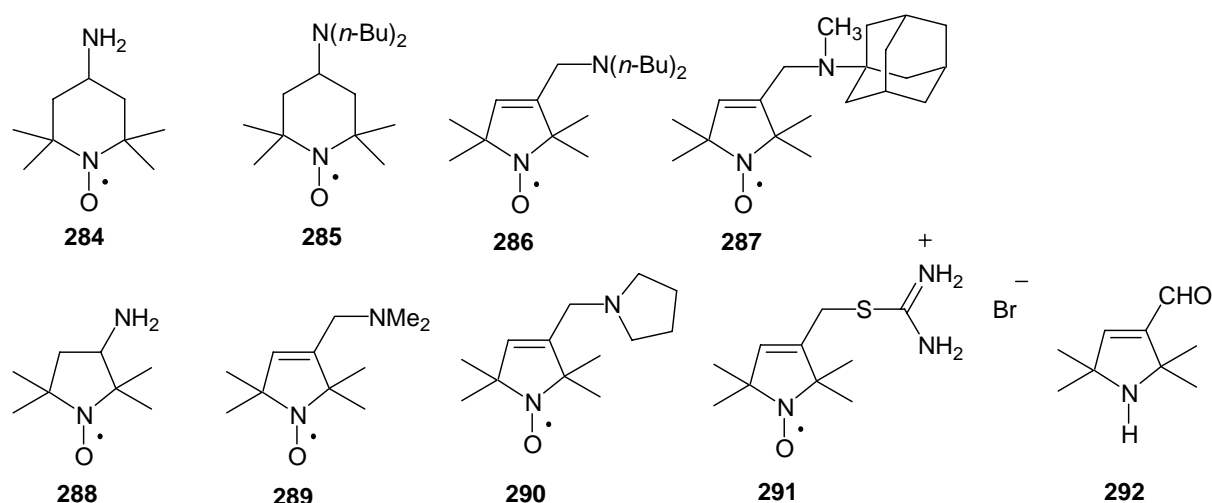
51. ábra: A nitroxidok és redukált származékaik lehetséges átalakulásai



52. ábra: Nitroxidok alkalmazása kooxidánsként alkohol aldehiddé v. ketonná történő oxidációjában

Krishna és munkatársai azt találták, hogy a nitroxidok szuperoxid diszmutáló (SOD) hatással is rendelkeznek, bár fiziológiai körülmények között (pH=7,4) ez az aktivitás kb. ezredrésze Cu,Zn-SOD enzim aktivitásának.<sup>114,115</sup> Goldstein és munkatársai azt találták, hogy nitroxidok a nitrogén-dioxidgyököt (NO<sub>2</sub>•) és a karbonátgyököt (CO<sub>3</sub>•<sup>-</sup>) tudják a leghatékonyabban eliminálni.<sup>116</sup>

Intézetünk az NIH (Bethesda) kutatóival különböző szubsztituenseket hordozó öt- és hattagú nitroxidok (**C** forma), és azok redukált származékainak (**B** és **A** forma) hidrogén-peroxiddal és ionizáló sugárzással szembeni védőhatását vizsgálta kínai törpehőrcsög (*cricetulus griseus*) V79 sejtvonalon.<sup>117</sup> A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a hidrogén-peroxiddal szemben szinte mindegyik nitroxid mutatott kisebb-nagyobb védőhatást, de legjobb hatást a hattagú nitroxidok és az amino szubsztituenst hordozó öttagú nitroxidok mutattak (**284**, **285**, **286**, **287**). Az ionizáló sugárzással szemben főleg az öttagú, aminocsoportot hordozó nitroxidok (**288**, **289**, **290**) és a **291** izotiuuróniumsó bizonyultak a legjobbaknak, míg **292** aldehid fokozta a sugárérzékenységet.

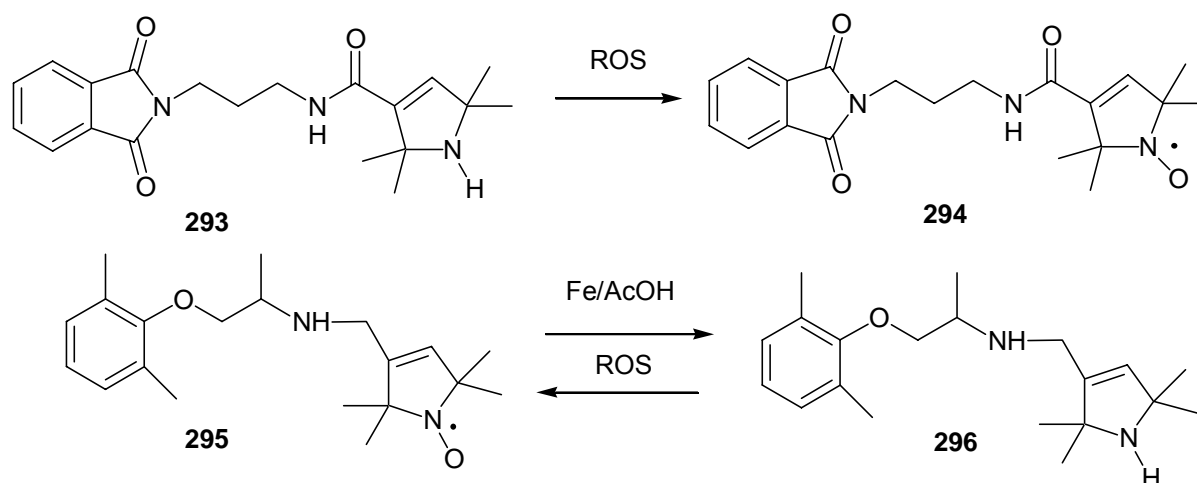


53. ábra: Hidrogén-peroxid és ionizáló sugárzás káros hatását V79 sejtvonalon kivédő nitroxidok és sugárérzékenységet fokozó szterikusan gátolt amin

Mindezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a nitroxidok alkalmasak az oxidatív stressz és sugárzás okozta károsodások kivédésére, a káros reaktív oxigénszármazékok (ROS) és reaktív nitrogénszármazékok (RNS) detoxikálására.

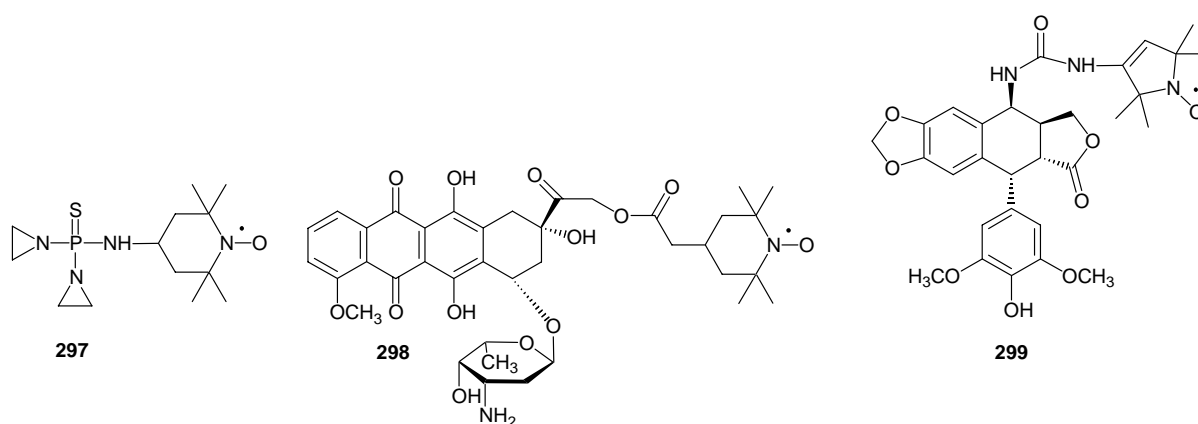
A ROS- és RNS-okkal szembeni védelem azonban csak akkor hatékony, ha a keletkezés helyén csapdázzuk a rövid élettartamú (1-10 nsec) káros szabad gyököket. Ennek megfelelően a nitroxidot kovalensen hozzá kell kapcsolni membránban akumulálódó vagy receptoraaffin molekulához. Ennek az elvnek az első felismerése és alkalmazása az 1980-as években történt, amikor Hideg és Hankovszky a Vaughan Williams-osztályozás szerinti 1B osztályba tartozó vegyületeket szabadalmaztattak. Ezek közül a **293** (H-2545) szívizom membránban akumulálódó kardioprotektív, antiarritmiás vegyület a klinika II. fázisig sikeresen eljutott.<sup>118</sup> Az utóbbi időben erről a vegyületről bebizonyosodott, hogy a kardioprotektív

hatását úgy fejt ki, hogy stabilis szabad gyökké (**294**, H-2954) oxidálódik.<sup>109,119</sup> A H-2954 vegyület szintén rendelkezik mérsékelt kardioprotektív hatással. A **293** vegyületről állatkísérletes modellen kiderült, hogy képes megakadályozni a tetraciklinek oxidatív metabolizmusa folytán fellépő szívizom károsodást is.<sup>120</sup> A **293** vegyület hatásmechanizmusának tanulmányozása kapcsán felmerült, hogy már forgalomban lévő, keringésre ható gyógyszert módosítsunk pirrolin gyűrűvel a kedvezőbb hatás reményében. A választás az antiaritmikumok közül a szintén IB osztályba tartozó mexiletinre esett. Ennek aminocsoportját alkilezve **10** brómvegyülettel jutottunk **295** vegyülethez. Ezt vaspör/jégecetes redukcióval<sup>121</sup> **296** vegyületté alakítottuk. Amerikai kutatókkal együttműködve azt találtuk, hogy **296** vegyület kiváló antioxidáns és 30 perces, mesterségesen előidézett iszkémia után a szívfunkciót (pl. balkamrai diasztolés vérnyomás) már 25 $\mu$ M koncentrációban 96%-ban visszaállította 45 perces reperfüzió után, míg erre a mexiletin csak 20%-ban volt képes. A hatást azzal lehet magyarázni, hogy a pirrolingyűrű csapdázza az iszkémia közben keletkező ROS-kat (54. ábra), erre utalt a **295** gyökké metabolizálódó amin ESR tripléttjének megjelenése.<sup>122</sup>



54. ábra: Pirrolin nitroxiddal és sztérikusan gátolt aminszármazékával módosított kardioprotektív szerek

A paramágnesesen módosított biológiaiilag aktív vegyületek közül az egyik legsikeresebb csoport a nitroxidokkal módosított daganatellenes szerek. Ezek közül a nitroxidgyűrűvel módosított **297** thiotepát,<sup>123</sup> **298** doxorubicint<sup>124</sup> és a sejtsztódást gátló paramágnesesen módosított podophyllotoxint<sup>125</sup> (**299**) emelem ki (55. ábra). Ezekre a vegyületekre az a jellemző, hogy kisebb általános toxicitással, de nagyobb antitumor aktivitással rendelkeznek. A hatásmechanizmus pontosan még nem ismert, de feltételezik, hogy a nitroxidok a hipoxiás daganatsejteket érzékenyebbé teszik a citotoxikus vegyületekkel szemben.



55. ábra: Paramágnesesen módosított daganatellenes szerek.

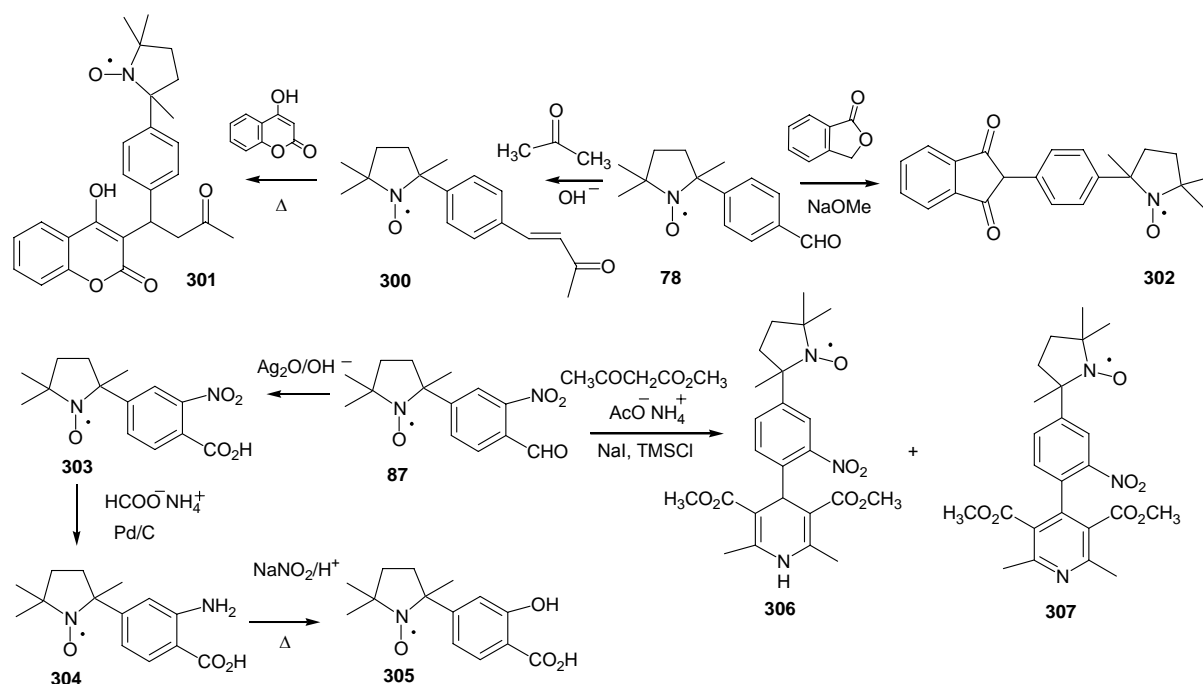
## 4.2. Saját vizsgálatok

### 4.2.1. Nitroxidgyűrűvel módosított gyógyszerek szintézise és vizsgálata

#### *A paramágneses benzaldehid-származékokból szintetizált vegyületek*

Az aromásgyűrűt tartalmazó paramágneses gyógyszerek szintéziséhez a 2-aril-pirrolidinek ideális kiindulási vegyületek. Így a **78** aldehidet aceton feleslegével lúg jelenlétében kondenzáltatva kaptuk **300** paramágneses 4-fenilbut-3-én-2-on-t majd ezt 4-hidroxi-kumarinnal vizes oldatban melegítve kaptuk 18% össztermeléssel a **301** paramágneses warfarin analógot. A másik véralvadásgátló vegyülethez, a **302** fenidionhoz **78** aldehid és ftalid NaOMe jelenlétében végzett reakcióján keresztül jutottunk. A **87** paramágneses 2-nitro-benzaldehid szintén kulcsvegyületnek bizonyult. A **87** aldehidet  $\text{Ag}_2\text{O}$ -dal karbonsavvá oxidáltuk, majd a nitrocsoportot aminná redukáltuk Ehrenkauffer-módszerrel, ezután az amint diazotáltuk és fenollá hidrolizáltuk és így jutottunk 4%-os össztermeléssel **305** paramágneses szalicilsavhoz.<sup>IX</sup> Egy, a közelmúltban leírt módszer szerint<sup>126</sup> a **87** aldehidből és metil-acetoacetáttal, ammónium-acetáttal nátrium-jodid és trimetilszilil-klorid jelenlétében acetonitrilben reagáltatvakaptuk 17%-os termeléssel **306** dihidropiridin-származékot, amely a Ca-csatorna blokkoló nifedipin paramágneses analógja. A reakció mellékterméke a **307** aromatizálódott vegyület (56. ábra).<sup>IX</sup>

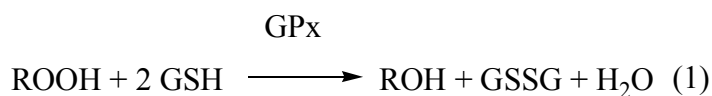
Paramágneses dihidropiridin-származékokat intézetünk munkatársai már korábban is szintetizáltak **9** aldehidből kiindulva, de az nem mímelte pontosan a nifedipin szerkezetét, mert az 1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolin-3-il szubsztituens közvetlenül és nem az aromásgyűrű szubsztituenseként kapcsolódott a dihidropiridin 4-es helyzetéhez.<sup>127</sup>



56. ábra: Benzaldehiddől és nitro-benzaldehiddől szintetizált, paramágnesesen módosított gyógyszerek

### A benzo[d]izoszelenazol-3-on-gyűrűs vegyületek

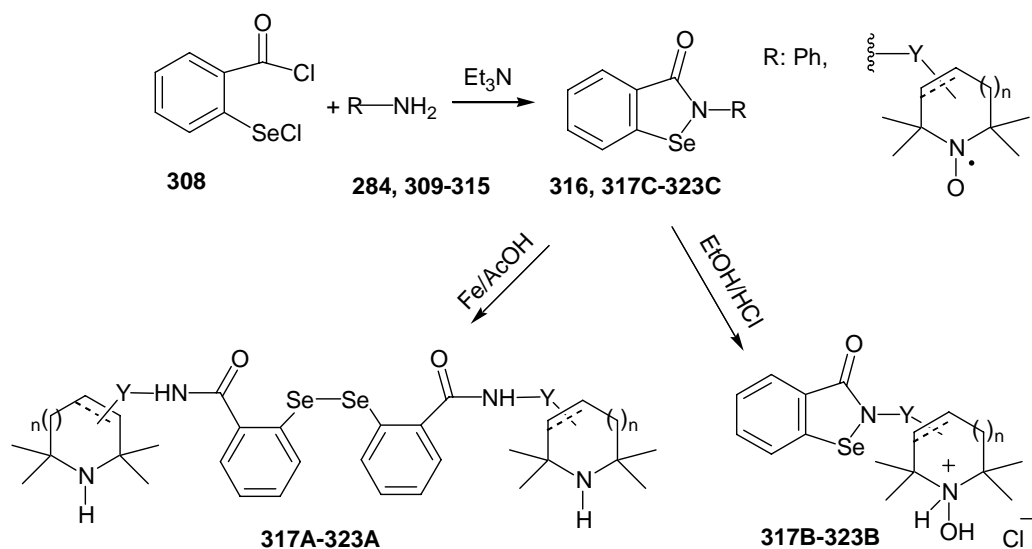
A paramágnesesen módosítható aromásgyűrűt tartalmazó vegyületek családjába tartozik a **316** ebselen elnevezésű neuroprotektív szer is amelyet a **308** 2-klórszelenil-benzoil-klorid és anilin (**309**) reakciójával szintetizáltak.<sup>128,129</sup> Az ebselen jelentősége, hogy a glutation-peroxidáz enzim (GPx)-szerű hatással rendelkezik, azaz hidrogén-peroxidot vízzé redukálja glutation részvételével (1).



Számos ebselen analógot szintetizáltak,<sup>130</sup> ezek hatékonyságát úgy is lehet mérni, hogy az általuk katalizált reakció kezdeti sebességét spektrofotometriásan meghatározzák.<sup>131</sup> Úgy gondoltuk, hogy érdemes lenne az antioxidáns hatású nitroxidokat az ebselennel ill. a benzo[d]izoszelenazol-3-on-gyűrűvel kombinálni. Az első választásunk a paramágnesesen módosított anilinnel (**310**) történő reakcióra, majd a korábban előállított és más esetekben is sikeresen alkalmazott paramágneses aminokkal (**284**, **311-315**)<sup>117,118</sup> történő reakcióra esett. A paramágneses aminokat reagáltatva **308** savkloriddal kaptuk (**317C-323C**) vegyületeket 35-73%-os termeléssel. A nitroxidokat etanolos sósavval megfőzve a **317B-323B** hidroxilamin-származékokat kaptuk, a **317C-323C** vegyületeket a vaspör-jégecetes reakcióval redukálva a

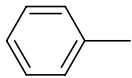
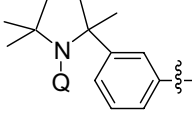


**317A-323A** szterikusan gátolt aminvegyületet tartalmazó diaril-diszelenidekhez jutottunk közepes (47-59%-os) hozammal. Ennek magyarázata, hogy a redukció során nemcsak a nitroxid redukálódik aminná, de a Se-N kötés is felhasad és a feldolgozás során a szelenol diszeleniddé oxidálódik (57. ábra). Az így kapott vegyületek katalitikus hatását indiai és német kutatókkal kooperációban vizsgáltuk. A **284**, **309-315** aminok szerkezetét és a **316-323** célvegyületek katalitikus hatását a **2. táblázat** mutatja.<sup>XVII</sup>

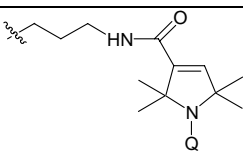
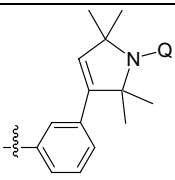
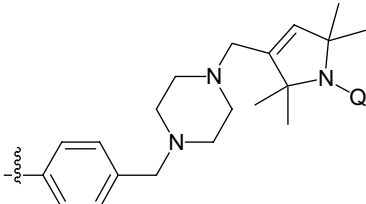
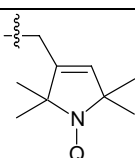
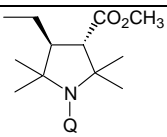
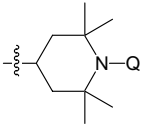


57. ábra: Paramágneses és diamágneses benzo[d]izoszelenazol-3-on-gyűrűs vegyületek és diaril diszelenidek szintézise.

**2. Táblázat:** Paramágneses és diamágneses ebselen analógok szerkezete és *t*-BuOOH bomlását katalizáló képessége ( $v_0$ ).

Amin	R	Célvegyület, Q	$v_0$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]*
<b>309</b>		<b>316</b>	12,16 $\pm$ 0,94
<b>310</b>		<b>317A</b> , Q=H	25,11 $\pm$ 0,16

## 2. Táblázat (folytatás)

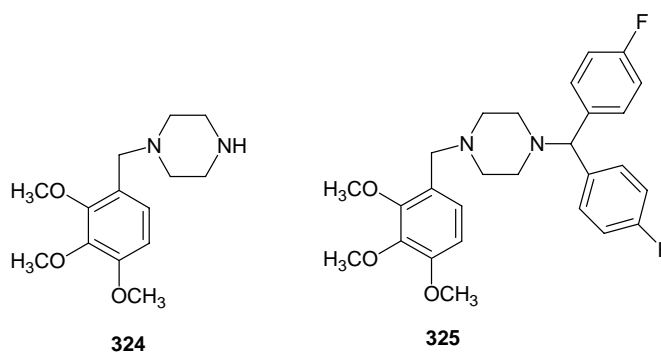
Amin	R	Célvegyület, Q	$v_0$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]
311		318A, Q=H 318B, Q=OH 318C, Q=O $\cdot$	19,18 $\pm$ 1,65 5,10 $\pm$ 0,95 30,94 $\pm$ 0,86
312		319A, Q =H	11.94 $\pm$ 0,41
313		320A, Q=H	30,13 $\pm$ 0,15
314		321A, Q=H 321C, Q=O $\cdot$	13,82 $\pm$ 0,46 22,11 $\pm$ 0,57
315		322A, Q=H 322C, Q=O $\cdot$	17,46 $\pm$ 0,76 14,05 $\pm$ 0,76
284		323A, Q=H 323C, Q=O $\cdot$	23,57 $\pm$ 0,76 21,65 $\pm$ 0,38

A 2. táblázat adatai alapján kijelenthetjük, hogy a legtöbb új ebselen analóg eléri, sőt meghaladja az alapvegyület (**316**) katalitikus aktivitását. Vizsgáltuk a H-2545 (**293**) és a H-2954 (**294**) vegyületek katalitikus hatását is, ezek 2.08 $\pm$ 0,61 és 2.21 $\pm$ 0,23  $\mu\text{M}/\text{min}$  nagyságúak voltak. A **318A** és **318C** vegyületektől ezek abban különböznek, hogy szelénatom helyett karbonilcsoport található bennük. Ha az ebselenre (**316**) jellemző értékhez hozzáadjuk a H-2545-re jellemző értéket (2,08+12,16=14,24) kisebb számot kapunk mint a **318A**-ra jellemző érték (19,18). Mindebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy nem pusztán additív hatásról van szó hanem a nitroxidok szinergizálják az izoszelenazolongyűrű katalitikus aktivitását, vagyis a nitroxidok és azok diamágneses származékai is részt vesznek a peroxidok detoxikálásában. Ezen vegyületek további előnye az ebselennel szemben, hogy vízben oldódnak. A szerkezet-hatás összefüggésekből az tűnik ki, hogy a legjobb **320A** és

**318 C** vegyületek poláros (amin ill. savamid) összekötőlánccal rendelkeznek. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a mexiletin módosításánál alkalmazott elv kiterjeszthető az ebselen-származékokra is. Ezért úgy gondoltuk, hogy az elv alkalmazható más gyógyszerekre is.

#### *A trimetazidin módosítása nitroxidokkal ill. diamágneses származékaikkal*

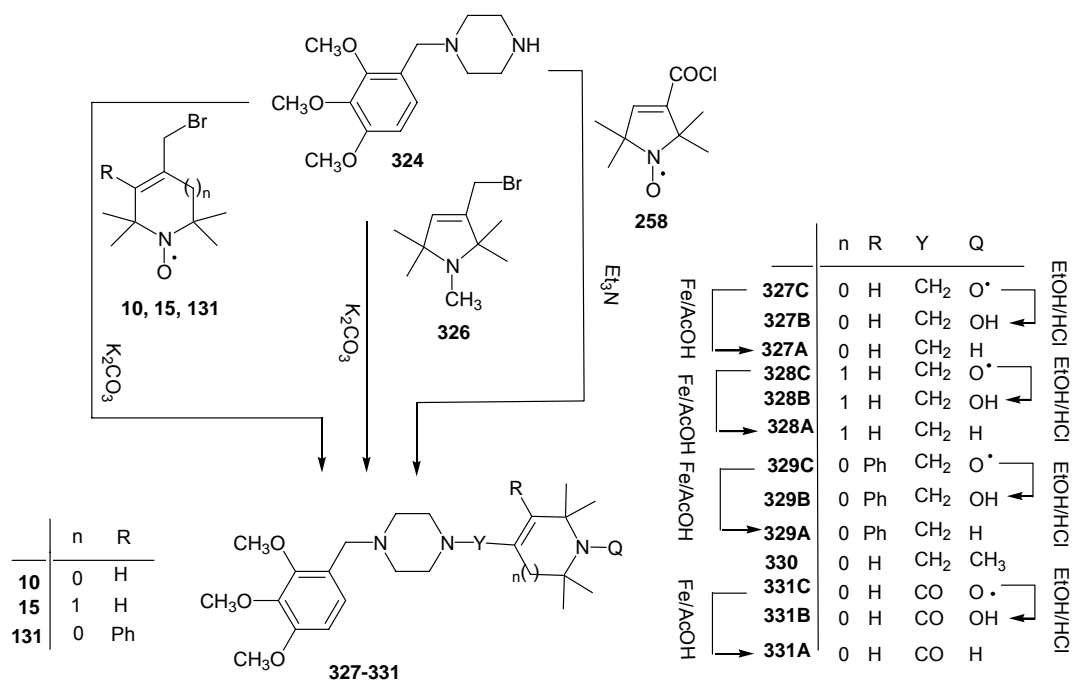
A trimetazidin (**324**) régóta ismert antiiszkémiás gyógyszer, amelyet idült anginás panaszok kezelésére is használnak. A hatás azon alapul, hogy gátolja a 3-ketoacil-koenzim-A-tioláz enzim aktivitását és a szívizomsejtek energiatermelő folyamataiban a zsírsav oxidáció helyett a glükóz oxidáció válik hangsúlyosabbá.<sup>132</sup> A trimetazidinnak ROS képződést gátló sajátságát is megfigyelték.<sup>133</sup> A szerkezet egyszerűsége több kutatót ösztönzött arra, hogy a szerkezet módosításával, főleg a piperazingyűrű szekunder nitrogénatomjának alkilezésével újabb származékokat szintetizáljanak. Ezek közül a lomerizin (**325**) volt talán a legsikeresebb, ezt migrénellenes gyógyszerként vezették be (58. ábra).<sup>134</sup>



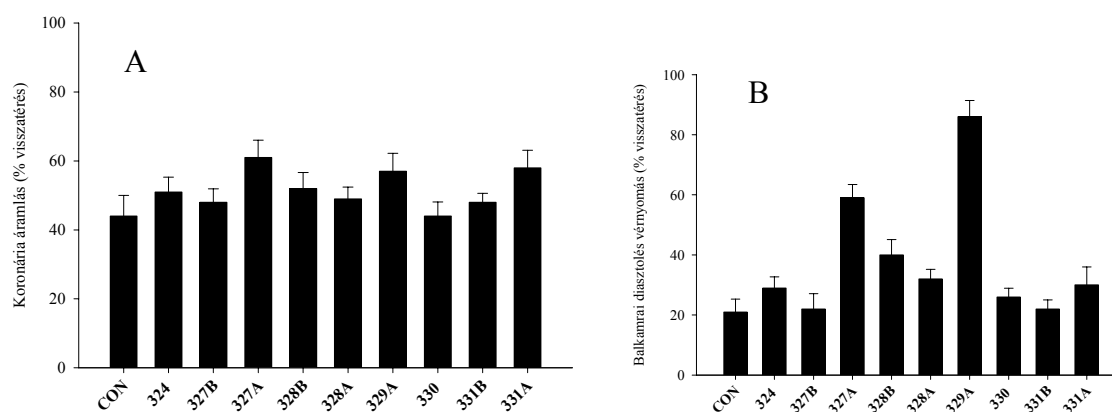
58. ábra: A trimetazidin és a lomerizin szerkezete

Intézetünkben a már bevált alkilezőszerekkel, a **10**, **15**, **131** allil-bromidokkal kloroformban,  $K_2CO_3$  jelenlétében reagáltatva a **324** vegyületet, a **327C-329C** vegyületekhez jutottunk 49-72%-os termeléssel. A **326** *N*-metil-allil-bromiddal **324** vegyületet főzve a **330** vegyületet kaptuk. A **324** vegyületet **258** savkloriddal acilezve a **331C** vegyületet eredményezte 63%-os hozammal. A nitroxidokat („C forma”) a megfelelő hidroxilaminokká („B forma”) redukáltuk etanolos sósavban történő forralással, vagy vaspör/jégecetes redukcióval a sztérikusan gátolt aminná („A forma”) alakítottuk (59. ábra). Az újonnan előállított vegyületeket az Ohio-i Egyetemen tesztelték közreműködő partnereink un. Langendorff-szív kísérletben. Az izolált patkányszívvel végzett kísérletben a **324**, **327A**, **327B**, **328A**, **328B**, **329A**, **330**, **331A**, **331B** vegyületek 50  $\mu$ M-os oldatával kezelték a szívet az iszkémia előtt. Ezután a véráramlás újbóli megindítása (reperfúzió) után vizsgálták a szív dinamikai

paramétereinek (balkamrai diasztolés vérnyomás, koronária áramlás és a szívteljesítmény) visszatérését. A tapasztalatok azt mutatták, hogy a koronária áramlásban nincs lényeges eltérés a kontroll (CON) és a trimetazidinnel (**324**) kezelt szívhez képest. A balkamrai diasztolés vérnyomás visszatérése **327A** (HO-2921NH) és a **329A** (HO-3630) vegyületek esetében igen jó, 60-80%-os visszatérést mutatott a kontroll és a trimetazidinnel (**324**) kezelt szív 20-30%-os értékeihez képest (60. ábra).



59. ábra: Nitroxidokkal és diamágneses prekurzoraikkal módosított trimetazidin-származékok szintézise.



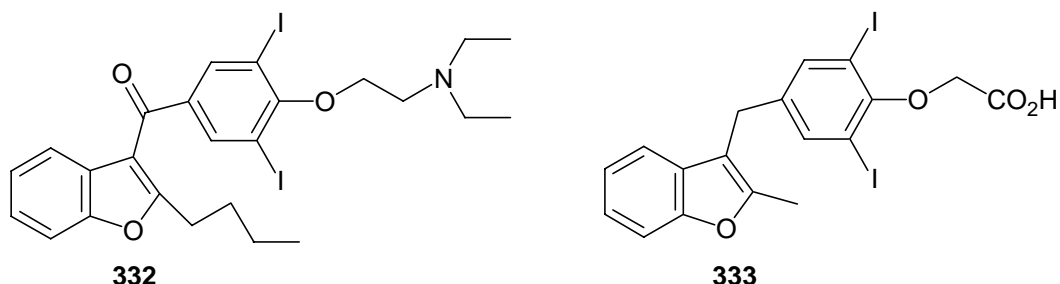
60. ábra: A kezeletlen kontroll (CON), a trimetazidinnel (**324**) és a trimetazidin-származékokkal kezelt szív koronária áramlásának (A) és a baloldali diasztolés vérnyomásának (B) visszatérése Langendorff-szíven 30 perces iszkémia és 45 perces reperfüzió után.

A **327A** és **329A** vegyületek hasonlóan támogatták a Langendorff-szív teljesítményének visszatérését is.<sup>xviii</sup> A **329A** (HO-3630) vegyület kiemelkedő hatása annak amfifil jellegére vezethető vissza, vagyis a ROS okozta károsodásokat mind a membránban, mind a citoszolban képes kivédeni. A trimetazidin módosítása ismét alátámasztja az ebselen-származékoknál és a mexiletinszármazékoknál tapasztaltakat, vagyis az alapmolekula nitroxidokkal vagy diamágneses származékaikkal történő módosítása az alapvegyület hatásspektrumát kedvezően befolyásolja. Ezt az elvet tovább igazolandó módosítottuk a Vaughan Williams-osztályozás szerint főként a III. hatástani osztályba sorolható amiodaront is.

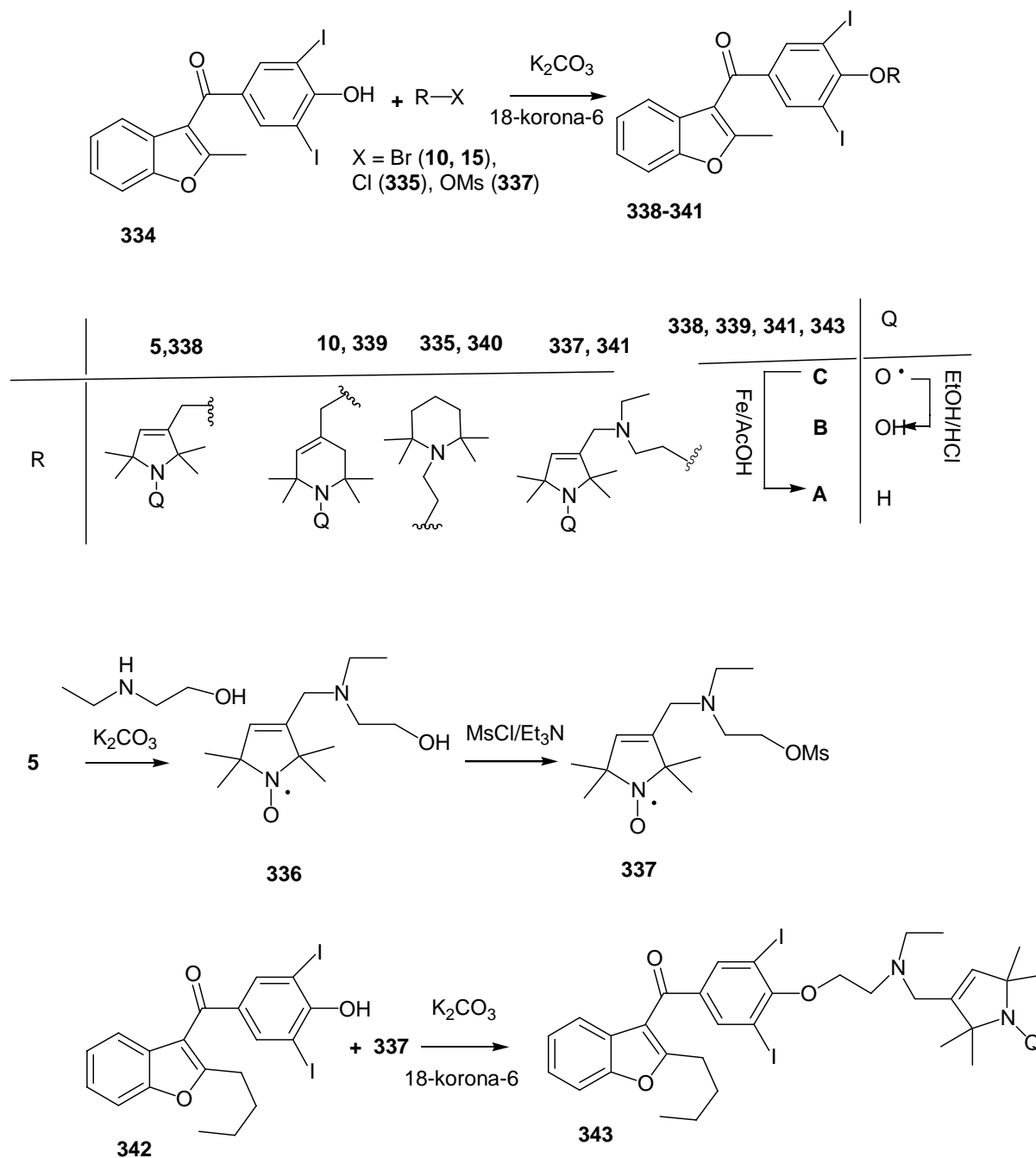
### ***Paramágneses és diamágneses amiodaron-származékok szintézise***

Az amiodaront (**332**) széleskörben használják mint antiaritmiás gyógyszert, a jelenleg használt szívgyógyszerek közül az egyik leghatásosabb.<sup>135</sup> Hátránya azonban, hogy számos káros mellékhatással rendelkezik. Ennek oka, hogy aktív metabolitja, az *N*-dezetil-amiodaron<sup>136,137</sup> lassan ürül ki a szervezetből, pajzsmirigy rendellenességek, fényérzékenység, izomgyengeség, májkárosodás és különböző neurológiai tünetek lépnek fel.<sup>138</sup>

A toxikus hatások kiküszöbölésére, a vegyület szervezetből történő kiürülésének meggyorsítására számos módosítást hajtottak végre a témával foglalkozó kutatócsoportok: a butil oldalláncot metilre cserélték, a bázisos oldalláncot savasra változtatták, illetve a karbonilcsoportot metilén csoportra redukálták. Így jutottak a **333** (KB1300015) vegyülethez<sup>139</sup> (61. ábra), amely állatkísérletes modellen nem növelte a vér LDL koleszterin szintjét, szemben a **332** amiodaronnal, így csökkentve a gyógyszer alkalmazása során esetlegesen bekövetkező infarktus kockázatát.



*N*-klóretil-2,2,6,6-tetrametil-piperidinnel<sup>140</sup> és a **337** meziláttal acetonban, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jelenlétében. Így kaptuk a **338C**, **339C**, **340**, **341C** vegyületeket, ill. a butil oldalláncot tartalmazó **343C** vegyületet 35-62%-os termeléssel. A kapott nitroxidokat azután hidroxilaminná („**B** forma”) alakítottuk, illetve vaspor/jégecetes redukcióval a sztérikusan gátolt szekunder aminná („**A** forma”) redukáltuk (62. ábra).<sup>XIX</sup>



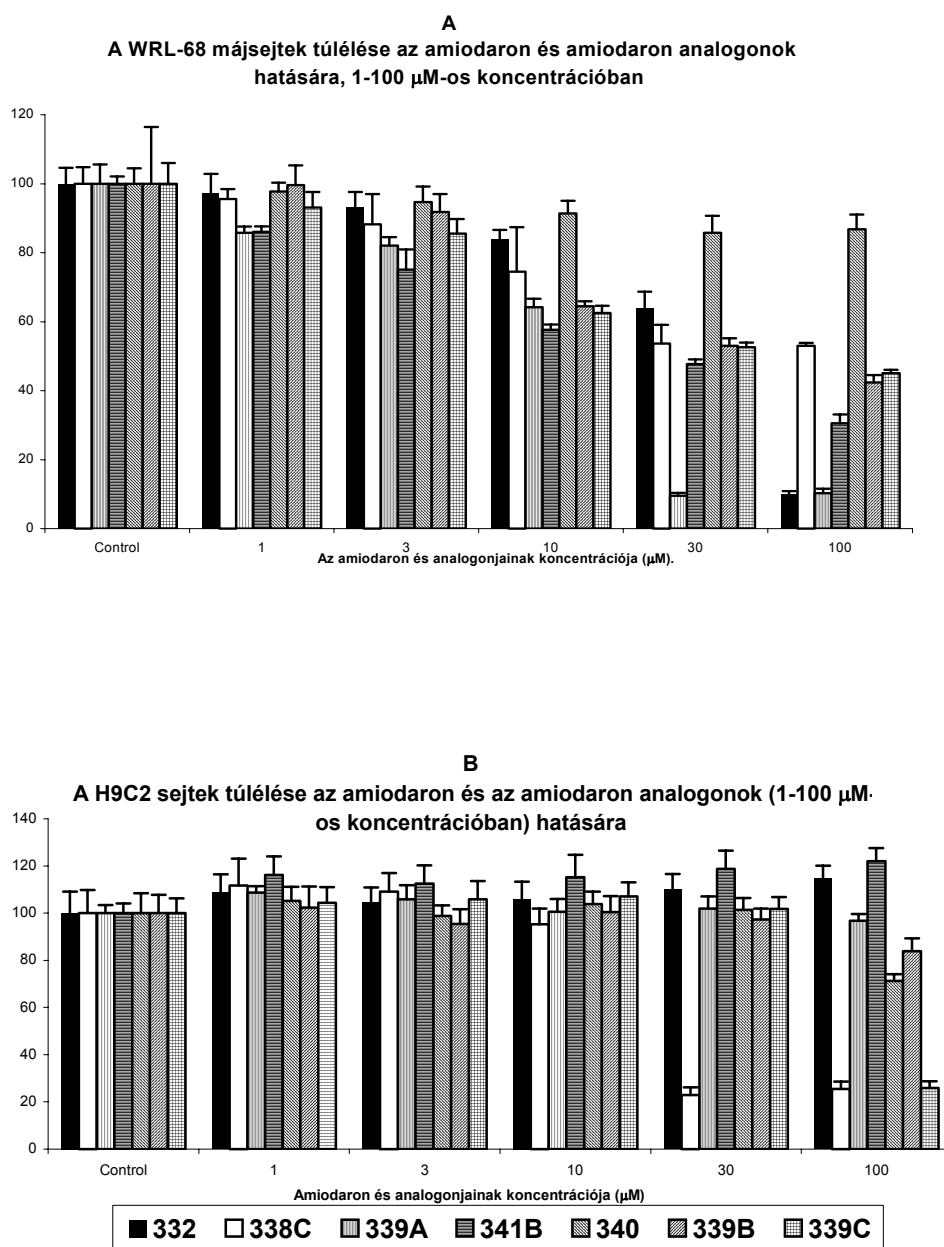
62. ábra: Diamágneses és paramágneses amidaron-származékok szintézise

Az előállított új vegyületeket egyetemünkön, a PTE ÁOK Biokémia és Orvosi Kémiai Intézetében tesztelték. Elsődlegesen a mitokondrium-membrán áteresztőképességének (MPT) változását vizsgálták az új vegyületekkel.<sup>141</sup> Az amiodaron (**332**) és az előállított származékok az MPT gátlásával érik el hatásukat, azonban a mechanizmusukban különböznek. A **332**, **339A**, **341A** megszünteti a kalciumionok hatására a membránban kialakuló ATP-H<sub>2</sub>O antiporterek működését, míg pl. **339B**, **340**, **341B** molekulák a klasszikus MPT gátló Cyclosporin A-hoz (CsA) hasonló sajátságokat mutatnak. Az amiodaron (**332**) gátló hatása már  $3,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$  koncentráció mellett mutatkozott, kevéssel magasabb dózisban ( $4,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) a mitokondriumok duzzadását figyeltük meg, amely a membránpotenciál összeomlásához vezethet (**3. táblázat**). A **339A**, **341A**, **341B** származékaink esetében azt tapasztaltuk, hogy az amiodaronhoz hasonlóan már  $10 \mu\text{M}$ -os koncentráció alatt kifejtik hatásukat az MPT-re. Amíg a **339A** és **341A** vegyület ED<sub>50</sub> koncentrációja ( $7,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ , illetve  $11,9 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ), alig magasabb az amiodaronnál, addig a CsA agonista **341B** (HO-3538/OH) csak lényegesen nagyobb dózisban ( $36,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ) okozott membránpotenciál összeomlást.

**3. Táblázat:** Az amiodaron-származékok MPT gátló koncentrációja (IC<sub>50</sub>) és effektív dózisa (ED<sub>50</sub>).

Származékok	IC <sub>50</sub>	ED <sub>50</sub>
<b>Amiodaron (332)</b>	$3,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$	$4,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$
<b>338A</b>	$6,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$	$13,4 \pm 3,0 \mu\text{M}$
<b>339C</b>	$15,8 \pm 2,1 \mu\text{M}$	$21,8 \pm 2,2 \mu\text{M}$
<b>339B</b>	$35,4 \pm 5,1 \mu\text{M}$	$51,3 \pm 6,1 \mu\text{M}$
<b>339A</b>	$2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$	$7,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$
<b>340</b>	$> 100 \mu\text{M}$	$123,5 \pm 9,7 \mu\text{M}$
<b>341B</b>	$4,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$	$36,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$
<b>341A</b>	$3,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$	$11,9 \pm 1,8 \mu\text{M}$
<b>343C</b>	$55,9 \pm 6,4 \mu\text{M}$	$29,7 \pm 4,8 \mu\text{M}$
<b>343A</b>	$52,7 \pm 4,9 \mu\text{M}$	$39,2 \pm 4,3 \mu\text{M}$
<b>338C</b>	$8,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$	$20,1 \pm 2,2 \mu\text{M}$

A táblázat adatiból kitűnik, hogy az új vegyületek mindenképpen kiszélesítették az MPT-gátlás illetve a membránpotenciál összeomlását előidéző koncentrációk közötti terápiás ablakot. Vizsgálták az új vegyületek toxicitását WRL-68 és H9C2 sejtvonalakon és azt tapasztalták, hogy magasabb koncentrációban a WRL-68 májsejtek túlélése jobb volt, mint az amiodaron estében (63. ábra).



63. ábra: Az amiodaron és analógjainak toxicitása máj- (A) és szívmusclesejteken (B).

A toxicitási és a mitokondrium-membránokkal végzett kísérletek alapján választottuk ki **339A** és **341B** vegyületeket. Ezeknek Langendorff-szíven történő vizsgálata azt mutatta,



hogy a  $^{31}\text{P}$  NMR mérések alapján a 5  $\mu\text{M}$  **341B** származékkal kezelt szívben állt vissza a kreatinfoszfát és az ATP koncentrációja az eredeti értékekhez képest a legnagyobb mértékben (**4. táblázat**). Mindezek alapján választottuk ki **341B** vegyületet, amellyel további állatkísérletek történtek.<sup>142</sup>

**4. Táblázat:** Az amiodaronnal (**332**) (10  $\mu\text{M}$ ), **339A** (10  $\mu\text{M}$ ) és **341B** (5 $\mu\text{M}$ ) kezelt szív kreatin és ATP szintjeinek visszatérése iszkémia/reperfúziót követően.

	Kontroll	<b>332</b>	<b>339A</b>	<b>341B</b>
Kreatinfoszfát (%)	35 $\pm$ 4	74 $\pm$ 6	54 $\pm$ 4	77 $\pm$ 6
ATP (%)	28 $\pm$ 5	45 $\pm$ 6	34 $\pm$ 3	54 $\pm$ 5

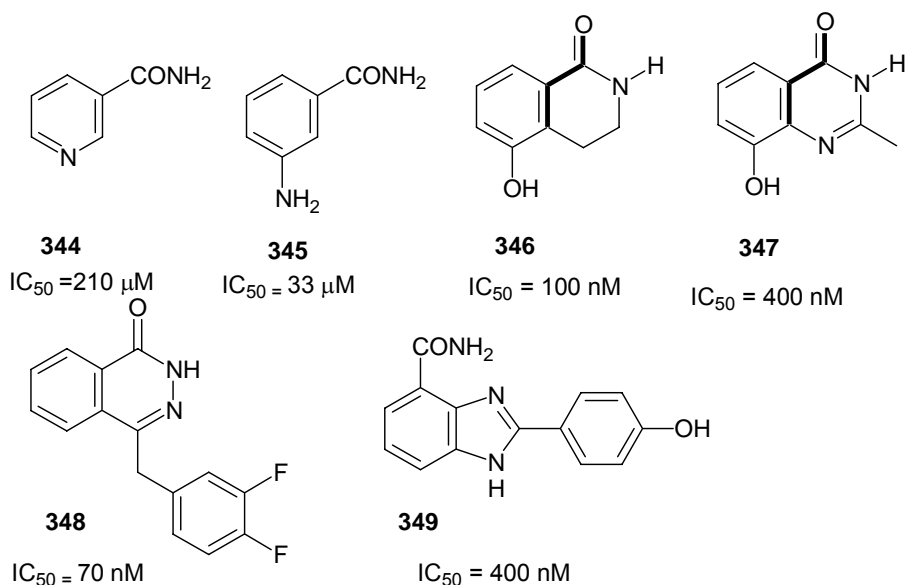
Összefoglalva, elmondhatjuk, hogy az amiodaron nitroxidokkal és diamágneses származékaikkal történt módosítása kedvezően befolyásolta a vegyület toxicitását és egyes származékok az eredeti vegyülethez képest hatékonyabbnak bizonyultak az iszkémia/reperfúzió utáni szerves foszfátok koncentrációjának visszaállításában. Mindezek összhangban vannak a mexiletin, ebselen, trimetazidin módosításánál tapasztaltakkal és az amiodaronra, mint összetettebb molekulára is igazolt az a tény, hogy a vegyületek megtartották eredeti hatásukat, kisebb toxicitással rendelkeznek, illetve hatásspektrumuk az antioxidáns hatással is bővült.

#### 4.2.2. Új, PARP-gátló vegyületek szintézise

##### 4-kinazolinon-származékok szintézise

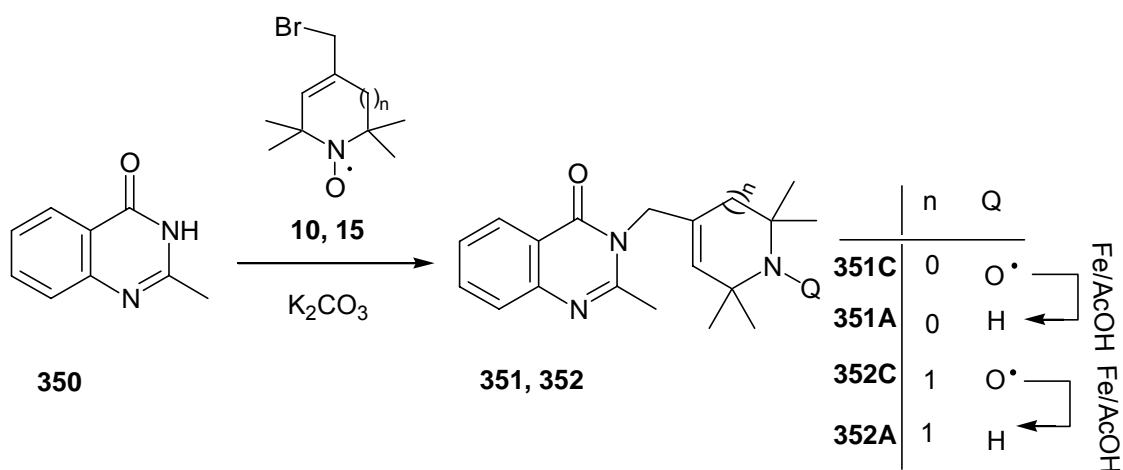
A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim az eukarióta sejtek DNS sérüléseinek javításában vesz részt. A PARP enzim a nikotinamid-adenin-dinukleotidot ( $\text{NAD}^+$ ) bontja nikotinamidra és poli(ADP-ribóz) egységekre, így a nikotinsavamid az enzim gyenge inhibitorának tekinthető. Bár a PARP-nak fontos szerepe van a genetikai hibák kijavításában, mégis, ha aktiválódik pl. sugárzás, mutagének vagy ROS hatására, ez a  $\text{NAD}^+$ , majd az ATP kiürüléséhez és végül sejtpusztuláshoz vezet. Az utóbbi évtizedben számos, a nikotinamidnál (**344**) ill. a 3-amino-benzamidnál (**345**) hatásosabb PARP-inhibitor molekulát szintetizáltak.<sup>143</sup> Általában ezek a vegyületek policiklusos laktám szerkezetűek, amelyekben az N-H csoport és az aromásgyűrű C=C kötéséhez képest *anti* térállású karbonilcsoport a közös szerkezeti elem. A teljesség igénye nélkül említjük a **346** izokinolinonvázis vegyületet, **347** kinazolin-4-onvázis vegyületet, **348** ftalazinonvázis vegyületet, a **349** 2-szubsztituált-4-

karboxamido-benzimidazolt, melyben a karboxamidcsoport helyzetét intramolekuláris hidrogénkötés rögzíti (64. ábra). Mivel a PARP enzim aktiválását a DNS lánc ROS által kiváltott törései, sérülései is okozzák, ezért úgy gondoltuk, hogy a PARP-gátló és a gyökfogó/antioxidáns szerkezeti elemek kombinálása a terápiás felhasználás szempontjából előnyös vegyületeket eredményezhet.



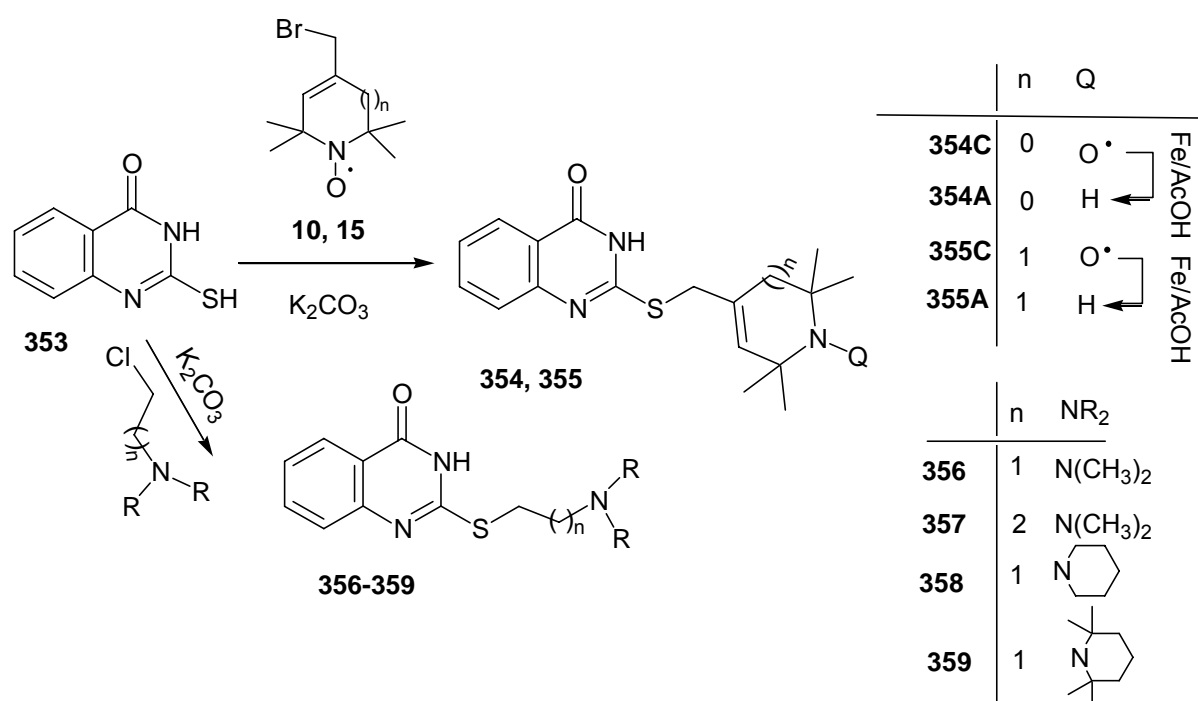
64. ábra: Néhány példa PARP-inhibitor vegyületekre

A legegyszerűbb módosításnak a 2-metil-kinazolin-4-on **350** 3-as nitrogénjének az alkilezése tűnt a **10** és **15** allil-bromidokkal, ez **351C** és **352C** vegyületeket eredményezte. Ezeket vaspor/jégecetben redukálva kaptuk a megfelelő **351A** és **352A** sztérikusán gátolt aminvegyületeket (65. ábra).



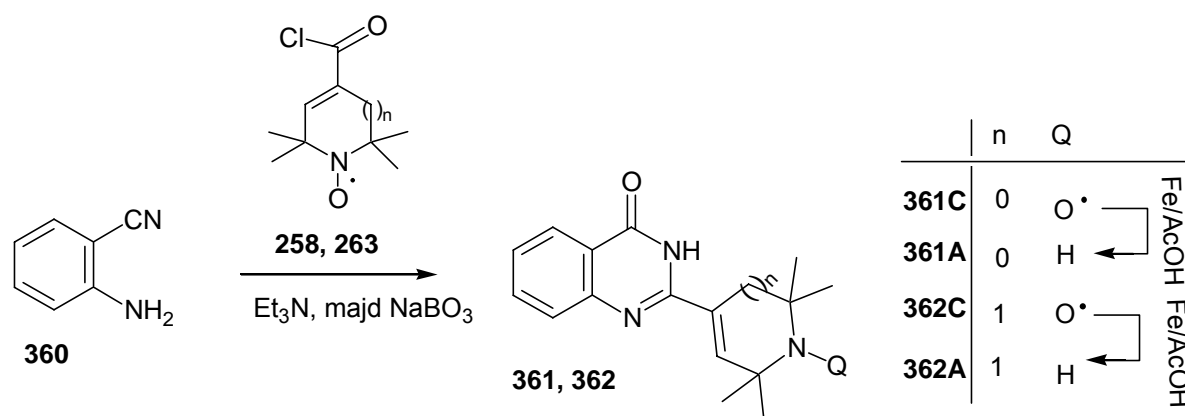
65. ábra: 3-szubsztituált-2-metil-4-kinazolinon vegyületek szintézise

Mivel **351**, **352** vegyületek nem védték ki a WRL-68 májsejtek hidrogén-peroxid okozta pusztulását,<sup>144</sup> ezért úgy határoztunk, hogy a CONH funkciót megőrzendő a 2-merkaptó-kinazolin-4-on (**353**) kénatomját alkilezzük **10** és **15** allil-bromidokkal, majd a 44-58%-os termeléssel kapott **354C** és **355C** vegyületeket a megfelelő **354A** és **355A** vegyületekké redukáltuk a szokott módon (vaspor/jégecettel). Összehasonlítás céljából néhány *N*-klóretil és *N*-klórpropil terciér aminnal is elvégeztük az alkilezést *N,N*-dimetil-formamidban K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jelenlétében, és 39-70%-os termeléssel kaptuk **356-359** vegyületeket (66. ábra)



66. ábra : 2-S-alkil-4(3H)-kinazolinon vegyületek szintézise

A paramágnesesen módosított kinazolin-4-on vegyületek szintézisének másik módja volt, hogy a **360** antranilsavnitrilt **258** és **263** savkloridokkal acilezzük, majd a kapott nyers savamid származékot nátrium-perboráttal vizes dioxánban főzve jutottunk **361C** és **362C** vegyületekhez.<sup>145</sup> Ezeket vaspor/jégecettel redukálva kaptuk **361A** és **362A** szterikusan gátolt aminokat (67. ábra).<sup>xx</sup>



67. ábra: Nitroxidokkal és redukált származékaikkal 2-szubsztituált 4(3H)-kinazolinon vegyületek szintézise

A vizsgáltuk az új kinazolin-4-on-származékok antioxidáns hatását és a PARP enzim gátlását.<sup>146</sup> A nitroxidokkal módosított származékok nem mutattak számottevő védőhatást a hidrogén-peroxid okozta oxidatív stressz ellen, míg a tercier aminocsoportot tartalmazó vegyületek (**356-359**) igen jó védőhatást és PARP enzim gátlást mutattak (**5. táblázat**).

**5. Táblázat:** Az új kinazolin-4-on-származékok PARP gátlása és oxidatív stresszel szembeni védő hatása *in vitro*

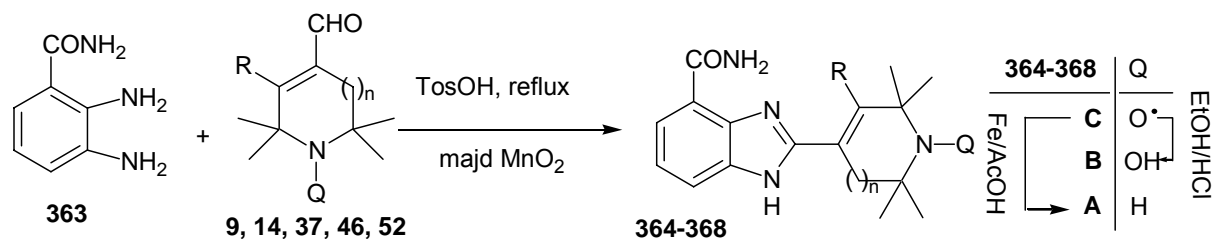
Vegyület	351A	355A	362C	362A	356	357	358	359
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -dal szembeni védelem (IC <sub>50</sub> ) (μM)	10	10	13	12	0,15	4,8	0,8	0,1
Maximális védés (%)	15	61	50	50	61	68	65	62
PARP enzim gátlás IC <sub>50</sub> (μM)	nv*	nv	nv	nv	2	6	2,6	1,6

\*nv: nem vizsgált

Várákosásainkkal ellentétben a nitroxidokat illetve azok diamágneses származékait tartalmazó kinazolin-származékok nem mutattak kiemelkedő hatást sem PARP gátlóként, sem a hidrogén-peroxid okozta károsodások kivédésére. Az *N*-etil-piperidin oldalláncot tartalmazó **358** vegyülettel (L-2286) további ígéretes állatkísérletes eredményeket kaptunk. Kiderült, hogy a **358** vegyület a Langendorff-szíven kiváltott ischemia-reperfúzió során és az izoproternollal kiváltott infarktus során a biokémiai jelátviteli folyamatok befolyásolása révén is kifejti hatását (Akt és p38-MAPK aktiválása ill. a c-Jun *N*-terminális kináz dezaktiválása) a PARP-gátlás mellett.<sup>147</sup>

#### A 4-karboxamido-benzimidazol-származékok szintézise

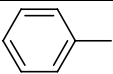
A nitroxidgyűrűvel módosított 4-karboxamido-benzimidazolok szintézisének egyik módja volt, hogy a 2,3-diaminobenzamidot<sup>148</sup> (**363**) és a paramágneses aldehidet (**9**, **14**, **37**, **46**, **52**) savkatalizált reakcióban vízleválasztó feltétellel toluolban főzzük, majd a toluol lepárlása utáni maradékot aktív MnO<sub>2</sub>-dal oxidálva jutottunk **364C**, **365C**, **366C**, **367C** és **368C** vegyületekhez 39-73%-os termeléssel (a XXI. szabadalomban több példa is van, de a rövidség kedvéért csak 5 jellemzőt emeltem ki). A kapott nitroxidokat vaspor/jégecetes reakcióban a szterikusan gátolt aminná (**364A-368A**) redukáltuk, illetve sósavas alkohollal főzve a pl. **365C**-t **365B** *N*-hidroxilaminná alakítottuk<sup>XXI</sup> (68. ábra).

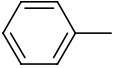
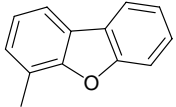
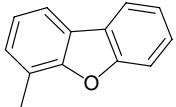


68. ábra: A 4-karboxamido-benzimidazolok előállítása

Az új, benzimidazol vegyületeket a PTE ÁOK Biokémia és Orvosi Kémiai Intézetében tesztelték. Vizsgálták a PARP enzim gátlást, a hidrogén-peroxid okozta sejtpusztulást (Antiox1) és a Fenton-reakcióban<sup>149</sup> generált hidroxilgyök csapdázást (Antiox 2). Az eredményeket a 6. táblázat foglalja össze.

**6. Táblázat:** Néhány 4-karboxamido-benzimidazol típusú, új PARP gátló antioxidáns és enziminhibítor hatása

Vegyület	n	R	PARP IC <sub>50</sub> nM	Antiox1 IC <sub>50</sub> nM	Antiox2 IC <sub>50</sub> nM
<b>364C</b>	0	H	721	23,3	0,5
<b>364A</b>	0	H	345	92,1	2,1
<b>365B</b>	1	H	26	23	9,6
<b>365A</b>	1	H	14	83	1,6
<b>366C</b>	0	Br	201	13	2,8
<b>366A</b>	0	Br	137	16,7	3,4
<b>367C</b>	0		1500	93,2	12,5

<b>367A</b>	0		310	98,5	0,4
<b>368C</b>	0		1800	79,2	5,3
<b>368A</b>	0		8200	78	70

Összefoglalva, a biológiai adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a sztérikusan gátolt aminosavakat tartalmazó PARP-gátlók jobb inhibitorai a PARP enzimnek. A nagyobb térigényű aromás szubsztituensek a pirrolingyűrűn (**367** és **368**) kedvezőtlenül befolyásolják a PARP enzim gátlását, mert feltehetőleg a molekula már nem tud illeszkedni a PARP enzim kötőhelyére. A vizsgált vegyületek közül a 6-tagú aminosav **365A** (HO-3089) vegyület bizonyult a legjobb inhibitornak. Erről a vegyületről azt is bizonyítottuk, hogy gátolja a vérlemezkék összetapadását is a PARP-gátlás mellett.<sup>150</sup>

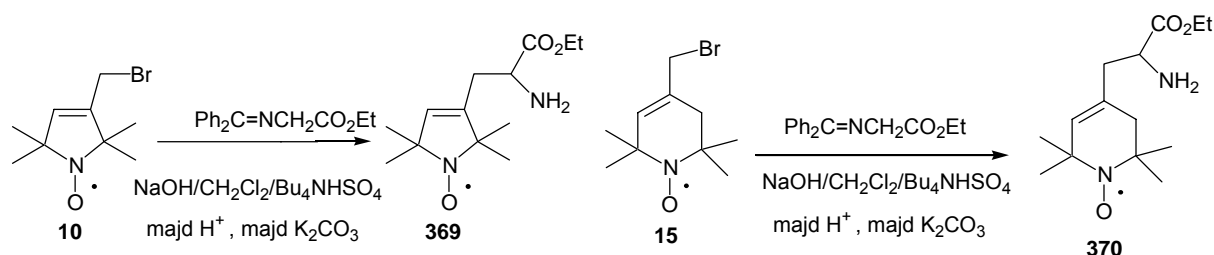
Ezért a HO-3089 vegyületet lehetett u. n. „vezető molekulának” kiemelni, de a többi vegyület is figyelemre méltó abból a szempontból, hogy nemcsak PARP gátlással, de antioxidáns (ROS-fogó) hatással is rendelkeznek (6. táblázat). A PARP-gátlóknál is bebizonyosodott a kardioprotektív szereknél már jól alkalmazott módszer: a nitroxidokkal vagy diamágneses származékaikkal módosított molekula az eredeti hatás mellett antioxidáns hatással is rendelkezik.

#### 4.2.3. A biofizikai vizsgálatok céljából szintetizált, paramágneses biomolekulák szintézise és alkalmazása

##### *Paramágneses aminosavak szintézise*

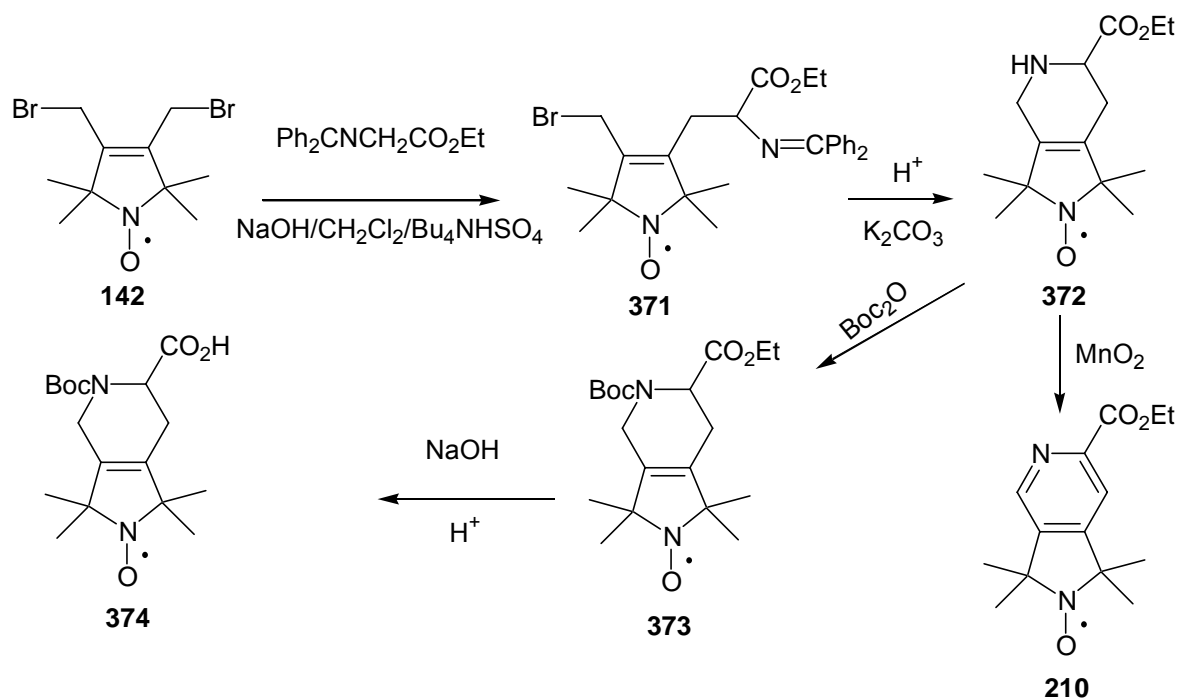
A fehérjék és más makromolekulák szerkezetének és funkciójának ESR spektroszkópiával történő vizsgálata úgy lehetséges, ha a diamágneses molekulákat paramágnesessé alakítjuk. Erre két módszer terjedt el. Az egyik a hely- és funkcióspezifikus spinjelölés, ezt az értekezés 2. fejezetében tárgyaltuk. A másik megközelítés, a paramágneses aminosavak szintézise és beépítése a fehérjeláncba, Merrifield-féle szilárd fázisú peptidszintézissel.<sup>151</sup> A TOAC (**187**)<sup>5</sup> aminosavat így építették be pl.  $\alpha$ -melanocita stimuláló hormonba a biológiai hatás elvesztése nélkül.<sup>152</sup> Újabban a széleskörben elterjedt „nonsense suppression” technika segítségével<sup>153</sup> is építenek be a peptidláncba aminosavakat, amikor is a

természetes peptidszintézist használják ki, és nemtermészetes aminosavval módosított *t*-RNS-en keresztül építik be a jelölő molekulát. Intézetünk amerikai kutatókkal együttműködve (Kaliforniai Egyetem, Davis) pirrolin nitroxiddal módosított ciszteint ill. tirozint épített be *Xenopus oocyta* fehérjébe.<sup>154</sup> Intézetünk munkatársai még az 1980-as években O'Donnell-szintézissel<sup>155</sup> előállították a **369**, **370** aminosavakat a **10** illetve **15** allil-bromidokból kiindulva (69. ábra).<sup>13,156</sup> Ezek hátránya, hogy tartalmaznak királis szénatomot, így rezolválni kell őket. A **369** előnye viszont, hogy a pirrolingyűrűs nitroxidok nagyobb stabilitása miatt a szilárdfázisú peptidszintézis reakciókörülményei között a nitroxid nem károsodik irreverzibilisen.



69. ábra: Pirrolin- és tetrahidropiridingyűrűt tartalmazó α-aminosavak szintézise

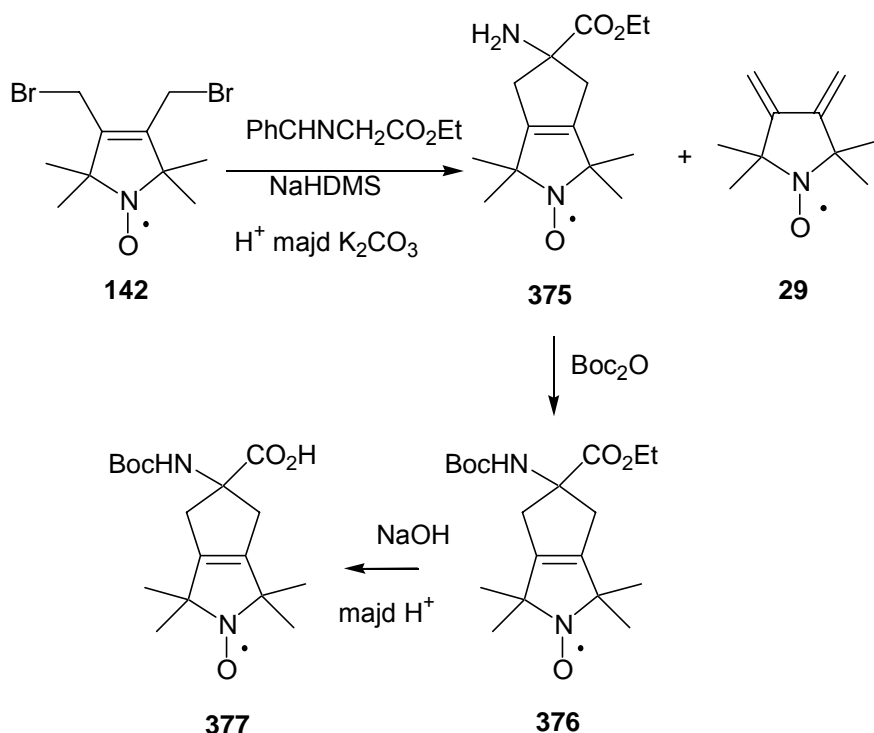
Úgy gondoltuk, hogy **369** nagyobb stabilitását és a TOAC<sup>5</sup> azon előnyét próbáljuk ötvözni az új aminosavban, hogy utóbbi kapcsolt molekula sajátmozgása kisebb, ezért jobban követi a peptidlánc konformációs mozgását és nem tartalmaz kiralitás centrumot. Először a **142** dibromvegyülettel alkileztük a dibenzilidén-glicint fázistranszfer körülmények között ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{aq. NaOH}/\text{Bu}_4\text{NHSO}_4$ ). Ekkor a **371** brómvegyület képződött, ami savanyítás (a Schiff-bázis hidrolízise miatt), majd lúgosítás után a **372** 1,2,3,6-tetrahidropiridinnel anellált pirrolin nitroxiddá zárt 63%-os termeléssel. Ezt mangán-dioxiddal oxidálva a korábban már előállított **210** piridingyűrűhöz anellált nitroxidot kaptuk. A **372** vegyületet mint paramágneses „homoprolin”-t tovább módosítottuk, a **374** *N*-Boc karbonsavvá alakítottuk át, amely a szilárdfázisú peptidszintézis körülményei között közvetlenül használható (71. ábra).



71. ábra: Paramágneses homoprolin szintézise

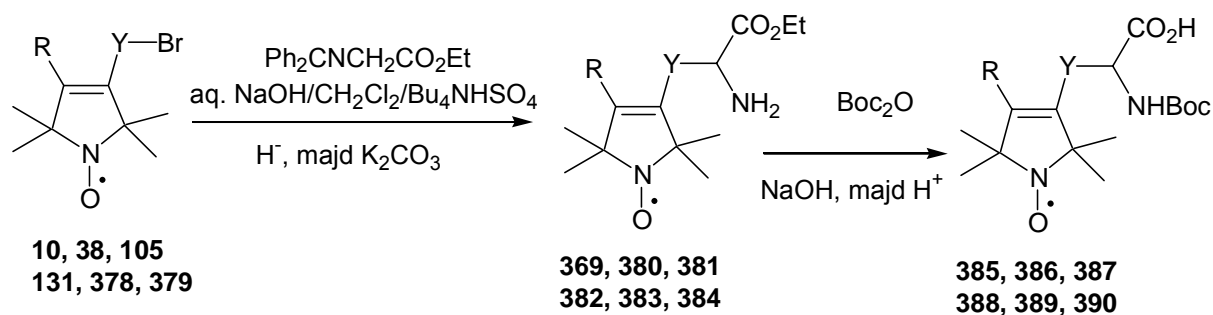
A TOAC-szerű pirrolin nitroxidot (**375**) a benzilidén-glicin-etil-észter alacsony hőmérsékleten, erős bázis (nátrium-hexametil-diszilazán) jelenlétében **142** dibrómvegyülettel végzett alkilezésével állítottuk elő Kotha és mtsai által leírt körülmények között.<sup>157</sup> A benzilidén- csoport hidrolízise után 15%-os termeléssel kaptuk a **375** vegyületet. Ezt a vegyületet PTOAC-nak neveztük el a pirrolin nitroxid és a TOAC kombinációjára utalva. A gyenge termelésre az ad magyarázatot, hogy konkurrens reakcióban elimináció is lejátszódik és **29** dién is keletkezik. A **375** aminosavat továbbalakítottuk **377** *N*-Boc savvá (72. ábra).<sup>XXII</sup>





72. ábra: TOAC-szerű, pirrolin gyűrűt tartalmazó aminosav (PTOAC) szintézise.

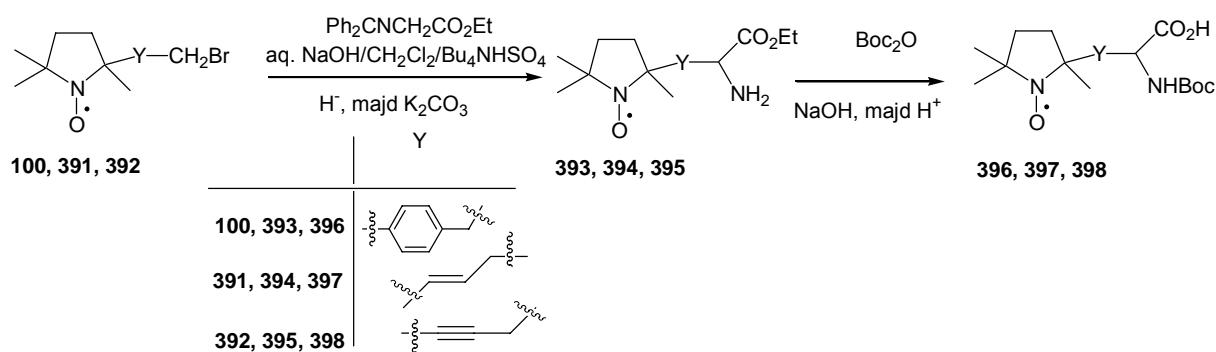
Az oldallánc rotációjában nem gátolt  $\alpha$ -aminosavak széles skáláját állítottuk elő az *N*-dibenzilidén-glicin-észter és a legkülönbözőbb polaritású, térkitöltésű paramágneses allilbromidok (**10**, **38**, **105**, **131**, **378**, **379**) reakciójával fázistranszfer körülmények között. Az így kapott vegyületek Schiff-bázisának hidrolízise, majd a reakcióelegy  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -tal történő lúgosítása után jutottunk **369**, **380**, **381**, **382**, **383**, **384** aminosav-észterekhez 8-65%-os termeléssel. Ezeket a vegyületeket *t*-butoxi-karbonilanhidriddel az aminosav nitrogénjén savérzékeny Boc-csoporttal védtük, majd az észtert **385-390** *N*-Boc-savakká hidrolizáltuk lúgos közegben (73. ábra). A **386** vegyület, mint brómatomot tartalmazó paramágneses aminosav, nem csak az ESR spektroszkópiás vizsgálatokat, de a stabilis izotópok ( $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$ ) jelenléte miatt a tömegspektrometriás és a röntgenkristallográfiai vizsgálatokat is elősegítheti. (Ezek a vizsgálatok folyamatban vannak.) A **389** azidoszármazékon utólag kialakítható egy  $\epsilon$ -aminocsoport lizin-szerű oldalláncot eredményezve, illetve Staudinger-reakcióban keresztkötések kialakítására alkalmas paramágneses aminosavnak is tekinthető.<sup>158</sup> A **387** és **388** vegyületek az aromás szubsztituenseikkel a fenilalanint hivatottak mímelni.<sup>XXIII</sup>



	R	Y
<b>10, 369, 385</b>	H	CH <sub>2</sub>
<b>38, 380, 386</b>	Br	CH <sub>2</sub>
<b>105, 381, 387</b>	H	
<b>131, 382, 388</b>	Ph	CH <sub>2</sub>
<b>378, 383, 389</b>	N <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>
<b>379, 384, 390</b>	H	

73. ábra: Oldallánc rotációjában nem gátolt pirrolin nitroxidokat tartalmazó  $\alpha$ -aminosavak szintézise.

Paramágneses aminosavakat 2-es helyzetben szubsztituált pirrolidin nitroxidokból is ki tudtunk alakítani. Ilyenkor a pirrolidingyűrű orientációja a makromolekulához kapcsolva jelentősen eltér a fentiekben említett 3-szubsztituált pirrolin nitroxidot tartalmazó vegyületek térállásától. Hátrányuk viszont az lehet, hogy ezek a vegyületek már két aszimmetria centrumot tartalmaznak. A disszertációban már említett **100** paramágneses benzil-bromidból és a korábban intézetünkben előállított<sup>159</sup> paramágneses, 2-szubsztituált allil- és propargil-bromidból (**391, 392**) nyertük O'Donnell-reakcióban **393-395** aminosav észtereket 13-39%-os termeléssel. Ezeket két lépésben *N*-védett karbonsavakká (**396, 397, 398**) alakítottuk (74. ábra). A fentiekben felsorolt, oldallánc rotációjában nem gátolt aminosavak szintézisének nagy előnye, hogy a 3,4-diszubsztituált pirrolin nitroxidokból, a keresztkapcsolási reakciók segítségével tetszőleges polaritású, oldallánc hosszúságú vagy reaktív oldalláncot tartalmazó paramágneses  $\alpha$ -aminosavak szintetizálhatók. A reakcióban azonban itt is racém-aminosavak képződnek, amelyeket beépítés előtt esetlegesen rezolválni kell. A **385** *N*-Boc aminosavat német kutatókkal (Max-Planck Intézet, Dortmund és az Osnabrück-i Egyetem) együttműködve c-Raf1 fehérje ras-kötő alegységének C-terminális részébe sikerült beépíteni.<sup>160</sup>



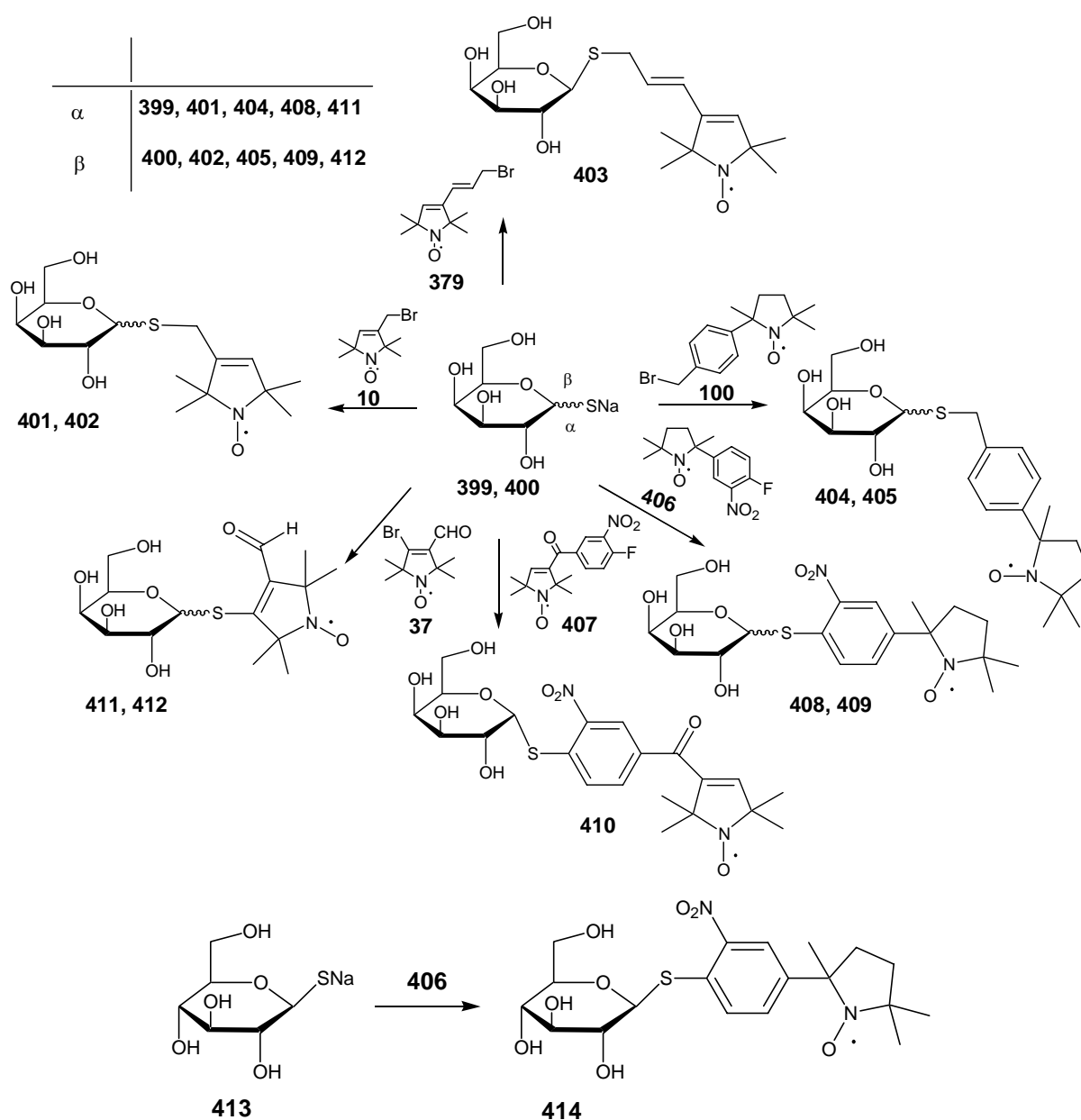
74. ábra: A 2-szubsztituált pirrolidin nitroxidokat tartalmazó paramágneses aminosavak szintézise.

### Paramágneses glükóz- és galaktóz-származékok szintézise és vizsgálata

A Howard Hughes Intézet, UCLA (Los Angeles, USA) kutatóival együttműködésben a paramágnesesen módosított galaktopiranozok *Escherichia coli* laktóz-permeáz fehérjéjéhez<sup>161</sup> (membrán transzportfehérje) történő kötődését vizsgáltuk. Ehhez 12 különböző spinjelölt galaktóz-származékot szintetizáltunk. A módosított galaktopiranozok kötődését ESR spektroszkópiával és a laktóz-permeáz 148-as helyzetű ciszteinjének a fluoreszcens 2-(4'-maleimidil-anilino)naftalin-6-szulfonsavval történő módosíthatóságán keresztül teszteltük.

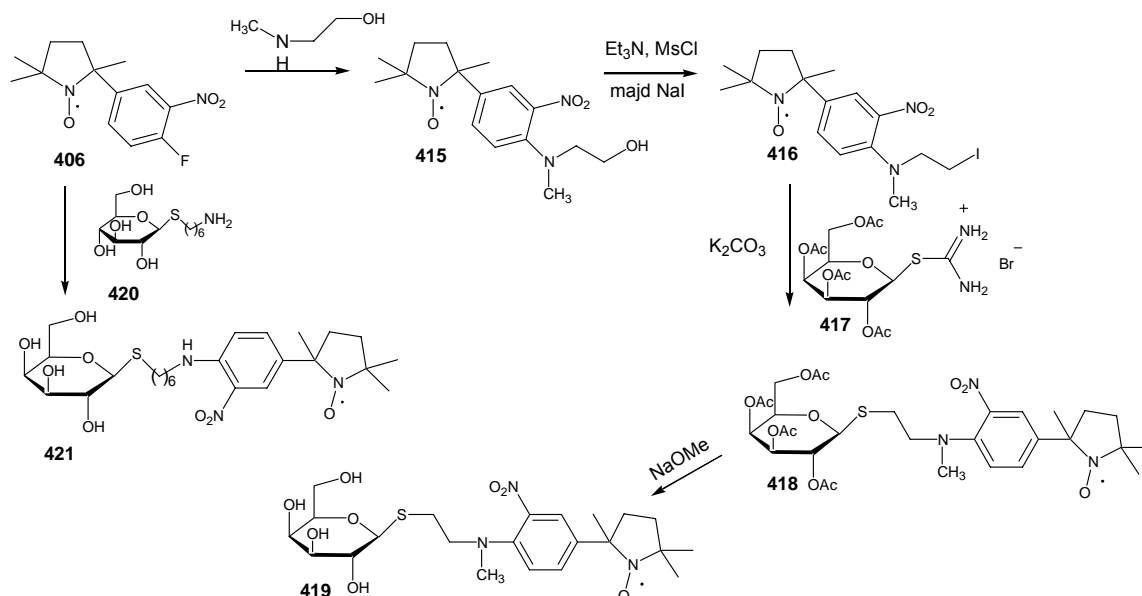
A **401-405** paramágneses galaktóz-származékokat a **399**  $\alpha$ -D-1-tiogalaktopiranoz illetve a **400**  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranoz nátriumsójának a **10**, **100** és **379** vegyülettel történő alkilezésével kaptuk 25-48%-os termeléssel. A Hideg és Hankovszky által korábban szintetizált paramágneses o-fluoro-nitrobenzol-származékokkal<sup>39</sup> (**406**, **407**) nukleofil szubsztitúciós reakcióban reagáltatva a **399** és **400** vegyületeket kaptuk a **408**, **409**, **410** származékokat 30-45%-os termeléssel. A **399** és **400** tiolokat a **37** aldehiddel addíciós-eliminációs reakcióban reagáltatva jutottunk **411** és **412** adduktokhoz 27-39%-os hozammal. A **406** vegyülettel reagáltatva a **413**  $\beta$ -D-1-tioglukopiranozt a **414** vegyületet kaptuk. (75. ábra). Ezek a vegyületek nem, ill. gyengén kötődtek a laktóz-permeáz fehérjéhez, ezért olyan újabb származékokat kellett előállítanunk, melyekben a spinjelző és a galaktóz között egy hosszabb összekötőlánc van. Ezt az elgondolást már korábban is sikeresen alkalmazták

fluoroforral módosított galaktopiranoz-származékok kötődésének vizsgálatánál.<sup>162</sup>



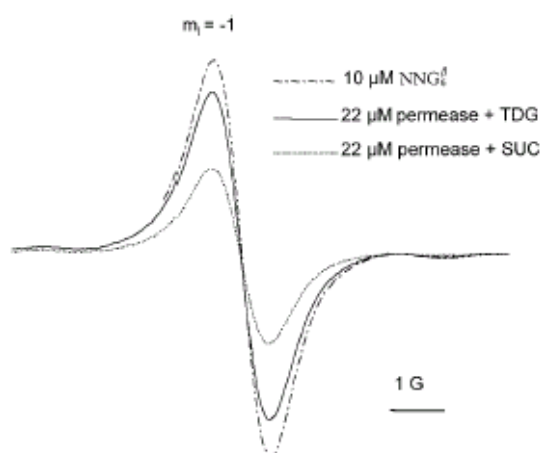
75. ábra: Paramágneses tiogalaktopiranoz és tioglükopiranoz-származékok szintézise.

Az első próbálkozásunk az volt, hogy a **406** vegyületet *N*-metil-etanolaminnal módosítva, majd **415** alkohol meziláton keresztüli jódra cserélésével előállított **416** vegyületet reagáltattuk **417** tetraacetyl- $\beta$ -D-galaktopiranozil-izotirónium-bromiddal,<sup>163,164</sup> végül a **418** vegyületet **419**-cé dezacetileztük.<sup>165</sup> Ez a reakciósor 3%-os össztermeléssel játszódott le. A másik, egyszerűbb eljárás az volt, hogy a kereskedelemben kapható 6-aminohexil-1-tio- $\beta$ -D-galaktopiranozidot (**420**) reagáltattuk **406** vegyülettel és a **421** vegyületet kaptuk 25%-os termeléssel (76. ábra).<sup>XXIV</sup>



76. ábra: Paramágneses 1-β-D-tiogalaktopiranozok szintézise 2-6 szénatomos alkil összekötőlánccal.

A kapott vegyületek közül a **421** mutatott legjobb kötődést a laktóz-permeáz fehérjéhez. A fehérje-szubsztrát komplex disszociációs állandója 22  $\mu\text{M}$  volt, szemben pl. **421** vegyület 500  $\mu\text{M}$  fölötti értékével. A kötődés az ESR spektrumon is jól látható: a szabad **421**-hez laktóz-permeáz adva az ESR jel intenzitása lecsökken (alsó görbe), és a kötött szubsztrátot tiogalaktóz hozzáadásával sem sikerült teljesen kiszorítani (középső görbe) (77. ábra). Ezen a területen tovább folytatjuk a munkát a metántioszulfonát csoportot tartalmazó galaktóz- ill. glükóz-származékok fehérjén történő kötődésének vizsgálatával.<sup>166</sup>

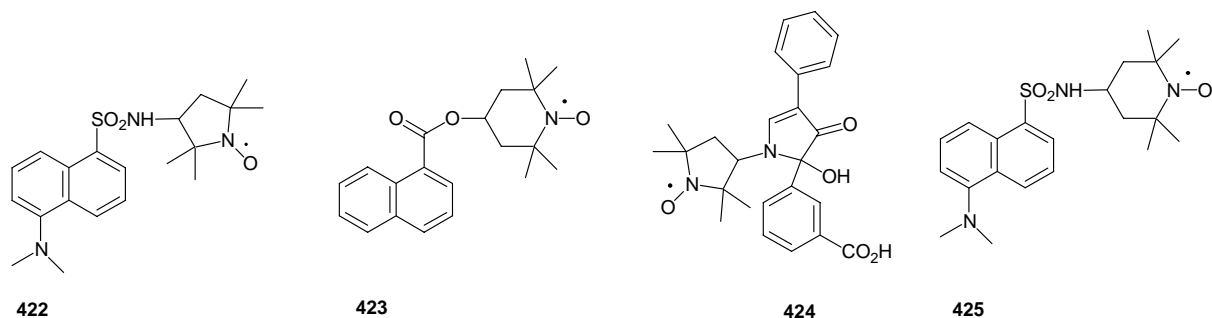


77. ábra: A **421** vegyület ESR spektrumrészletének (---) változása laktóz-permeáz fehérjén történő kötődés (.....) hatására és tiogalaktóz hozzáadásával (-).

## 5. Kettősen (spin és fluoreszcens) jelölő reagensek szintézise és alkalmazása

### 5.1. Irodalmi háttér

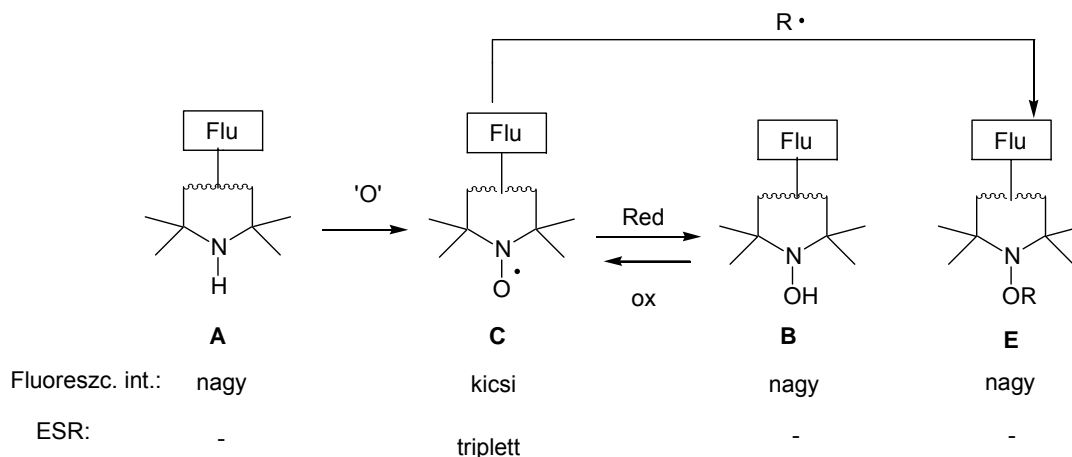
Az első, nitroxidhoz kovalens kötéssel kapcsolt molekulát, a **422** danzilezett nitroxidot Griffith es Stryer alkalmazta a spinjelölt dinitrofenil-haptén rotációs relaxációs idejének a meghatározásához.<sup>167</sup> Már ekkor nyilvánvalóvá vált, hogy a nitroxidok csökkentik vagy kioltják a fluoreszcens festékek fluoreszcenciáját, még akkor is, ha nem kötik össze a nitroxidot és a fluorofort kovalens kötéssel. Green és munkatársai különböző poliaromás vegyületek di-*tert*-butilnitroxiddal történő fluoreszcencia kioltását vizsgálták, különböző polaritású oldószerekben oldva a fluorofor és a nitroxid keverékét. A kioltási folyamat sebességi állandója  $7\text{--}28 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  értéknek adódott, tehát diffúziókontrollált folyamatot lehet feltételezni.<sup>168</sup> A fluoreszcencia kioltás négy fő mechanizmus szerint történhet:<sup>169-171</sup> Förster-mechanizmus (rezonancia energia transzfer), Dexter-mechanizmus, elektroncserélődéssel járó szingulett-triplett átmenet (intersystem crossing) és töltések szétválásával járó elektronátmenet. Green a di-*tert*-butilnitroxidok kioltási mechanizmusára az elektroncserélődéssel járó szingulett-triplett átmenetet valószínűsítette.<sup>169</sup> Blough szintén ilyen következtetést vont le a **423** és **424** vegyületek kioltási mechanizmusára vonatkozóan.<sup>171,172</sup> Intézetünk munkatársai orosz és izraeli kutatókkal együttműködve a **425** danzilezett hattagú nitroxid kioltási mechanizmusát vizsgálták és szérumalbuminban töltés szeparációs mechanizmust is feltételeztek a szingulett-triplett átmenet mellett.<sup>173</sup> A területen dolgozó Likhtenshtein és Blough kutatásai szerint a kioltás bizonyos esetekben kevert mechanizmusú, és a szóbjöhető mechanizmusok dominanciája a gyűrű tagszámától (redoxpotenciáljától), az alkalmazott oldószer polaritásától, a fluorofor jellegétől és a donor-akceptor vegyületeket összekötő lánc hosszától, merevségétől is függhet (78. ábra).



78. ábra: Korábban szintetizált és vizsgált fluorofor-nitroxid, (donor-akceptor) vegyületek

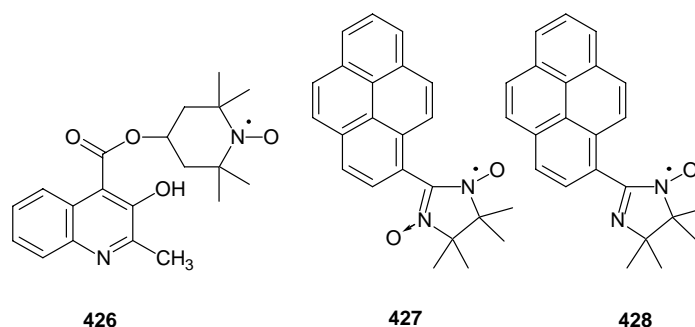
Ez az intramolekuláris fluoreszcencia kioltással bíró vegyületcsalád azért kapott jelentős figyelmet, mert számos analitikai alkalmazása lehetséges. A nitroxid oxidációs

állapota ugyanis jelentősen befolyásolja a fluoreszcencia intenzitását. Az “**A**, **B**, **E** szerkezetű” diamágneses molekulák ugyanis erősebben (akár 1 nagyságrenddel nagyobb a kvantumhatásfok) fluoreszkálnak, mint a paramágneses “**C** szerkezetű” vegyületek (79. ábra).



79. ábra: A nitroxid-fluorofor (donor-akceptor) molekulák ESR és fluoreszcencia sajátságainak változása a nitroxid oxidációs állapotától függően.

Az ilyen típusú fluorofor-nitroxid vegyületeket - mivel a változás mind ESR, mind fluoreszcencia spektroszkópiával követhető - kettősen jelölő reagenseknek vagy szenzoroknak nevezték el. Ezen vegyületek további előnye, hogy a fluoreszcens detektálás lehetősége miatt a redukálószer, oxidálószer vagy szabad gyök akár nanomolos ( $10^{-9}\text{M}$ ) koncentrációban is kimutatható. A **423** és a vízzeloldékonyabb **424** vegyületeket spincsapdaként<sup>112,174,175</sup> és redox indikátorként<sup>176</sup> is sikeresen alkalmazták. Újabban a **426** molekulát használták fenolok antioxidáns kapacitásának fluorimetriás vizsgálatára,<sup>178</sup> valamint Likhtenshtein és munkatársai a **427** nitronil-nitroxidhoz kapcsolt pirén fluorofort használták szuperoxidgyök kimutatására.<sup>178</sup> Kínai kutatók a **428** iminonitroxidról megállapították, hogy savakkal és redukálószerekkel optikai “ÉS-kapu”-ként képes működni, azaz az iminonitrogén protonálása és a nitroxid egyidejű redukciója hidroxilaminná eredményezi a fluoreszcencia serkentést (80. ábra).<sup>179</sup>



80. ábra: Szuperoxidgyök, antioxidánsok kimutatására alkalmas kettős szenzor reagensek.

## 5.2. Saját vizsgálatok

Ebben a fejezetben a nitroxidok különböző fluoroforokhoz történő kapcsolásáról számolok be. A különböző fluoroforok természetesen más-más hullámhosszon fluoreszkálnak. Ennek figyelembe vétele a biológiai vizsgálatok szempontjából lényeges, hiszen célszerű olyan fluoroforokat alkalmazni, amelyeket nem zavar a biológiai rendszer háttér fluoreszcenciája. Az újonnan, különböző reakciókkal (alkilezés, acilezés, aromás nukleofil szubsztitúció, Suzuki-reakció, gyűrűzárás kondenzációs reakcióval) előállított nitroxid-fluorofor vegyületeknek javarészt csak az optikai sajátságait ill. azok változását vizsgáltuk, kiterjedt biológiai vizsgálatot csak két danzilszármazékkal végeztünk. A nitroxid-fluorofor vegyületek hátránya, hogy sok esetben korlátozott a vízdoldhatóságuk és a vízdoldhatóságot biztosító szubsztituensek beépítésekor (pl. aminok) viszont körültekintőnek kell lennünk, hogy a protonálódás vagy átmenetifémionok jelenléte (pl. fotoindukált elektrontranszfer) miatt milyen fluoreszcencia intenzitás növekedés vagy csökkenés következik be.

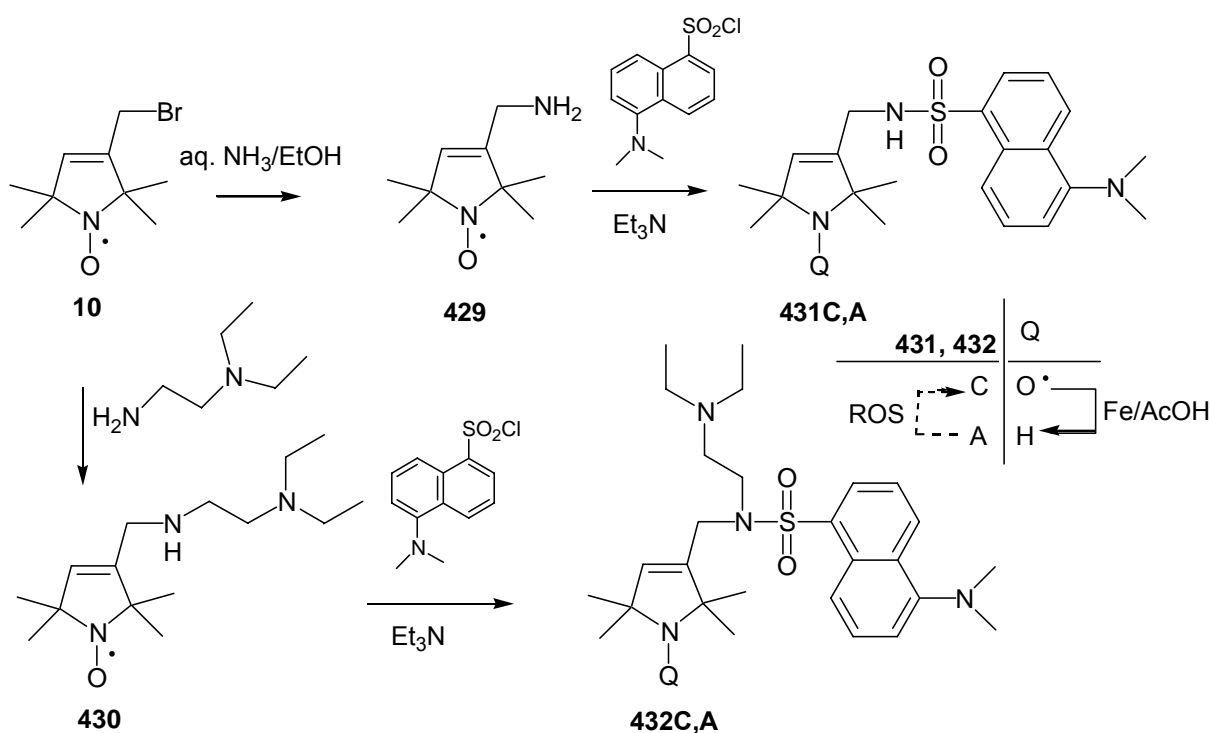
### 5.2.1. Reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok (ROS, RNS) kimutatására alkalmas szenzorvegyületek szintézise és vizsgálata

#### *Danzilszármazékok szintézise és vizsgálata*

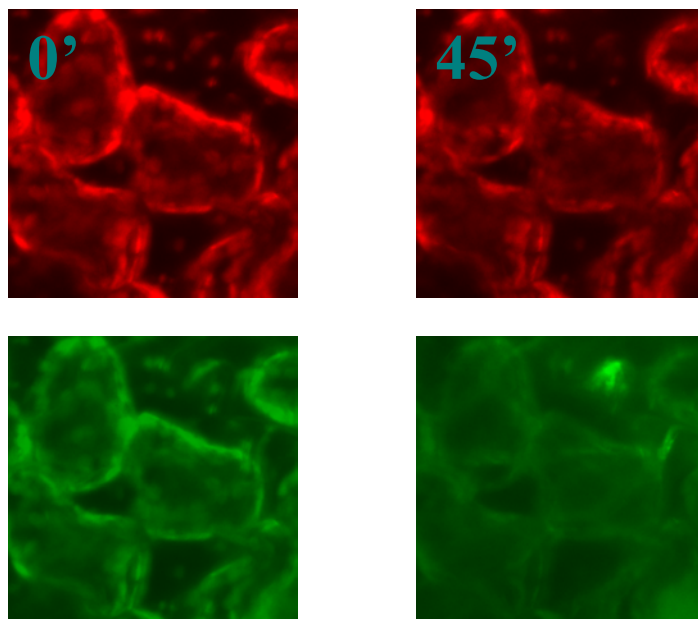
A danzilszármazékok szintézisét **422** és **425** vegyületekből kiindulva úgy fejlesztettük tovább, hogy nemcsak a nitroxidot, hanem a szterikusan gátolt aminszármazékot tartalmazó vegyületeket is előállítottuk. Úgy gondoltuk, hogy ha a **293** szívre ható vegyületnek *in vivo* bekövetkezik a **294** nitroxiddá történő oxidációja,<sup>109</sup> akkor ez az elv alkalmazható a danzilezett származékokra is, de itt valamilyen fluoreszcencia változás is bekövetkezik. Ennek megfelelően, ha a **10** allil-bromidot ammóniával reagáltatjuk, akkor **429** aminhoz jutunk, illetve dietilamino-etil-amin feleslegével **430** vegyületet kaptuk. Ezeket a vegyületeket savmegkötő (pl. trietilamin) jelenlétében reagáltatva danzil-kloriddal **431C** és **432C** vegyületekhez jutottunk. Ezeket a vegyületeket vaspör/jégecet keverékével redukálva jutottunk **431A** és **432A** vegyületekhez<sup>XXV,XXVI</sup> 14-22%-os össztermeléssel (81. ábra). A **432A** vegyületről bebizonyosodott, hogy alkalmas ROS, különösen pedig a szingulett oxigén csapdázására.<sup>180,181</sup> Ennek következtében az eredetileg diamágneses **432A** vegyület (rövidítve: DanePy) fluoreszcenciája lecsökken, mert a stabilis nitroxid szabad gyököt tartalmazó vegyület **432C** keletkezik belőle, ami kioltja a fluoreszcenciát (82. ábra). A DanePy (**432A**) vegyületet az MTA-SzBK kutatóival sikeresen alkalmaztuk



növényben abiotikus stressz körülmények között (alacsony hőmérséklet, parakvát, UV-B sugárzás és fotoinhibíciót okozó nagy intenzitású megvilágítás) képződő ROS kimutatására. A kísérletekben a fotoszintézis kutatásban modell-növényként használt spenót (*Spinacea oleracea* L.) levelei és elektron- transzport aktivitást mutató membrán kivonatai mellett, lóbab (*Vicia faba* L.), borsó (*Pisum sativum* L.), dohány (*Nicotiana tabacum* L.) és a növényi genomikában kiemelt jelentőségű lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L.) leveleket használtunk.<sup>182-184</sup> A **431A** vegyületről kiderült, hogy mind szingulett oxigént, mind a szuperoxid gyökianiont képes csapdázni. Ezekkel a vegyületekkel *in vivo* kísérletekben sikerült megállapítani, hogy a fotoszintetikusan aktív spektrumú, de a nevelési körülményeknél nagyobb mértékben alkalmazott fény okozta stressz hatására a növények leveleiben szingulett oxigén keletkezik, viszont a napfény ultraibolya komponensei szuperoxid gyökianion termelődéséhez vezetnek: vagyis a két, növényfiziológiailag hasonló károsodást okozó stressz hatása mögött más oxidatív kémiai mechanizmusok állnak. Ez a megállapítás az eredmények gyakorlati alkalmazása, stressztűrőbb gazdasági növények nemesítése szempontjából jelentős.<sup>185,186</sup>

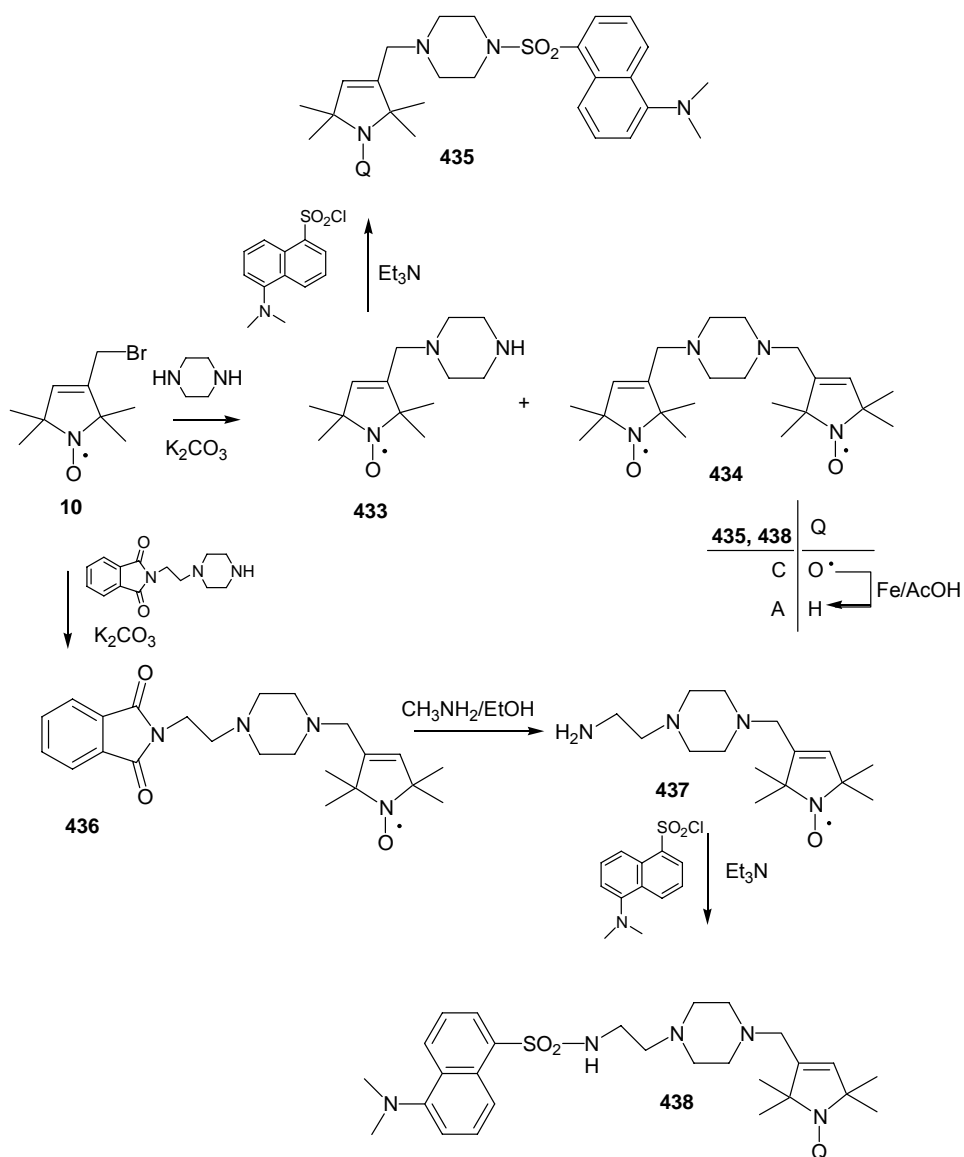


81. ábra: A szingulett oxigén és a szuperoxid gyökianion (ROS) kimutatására alkalmas danzilszármazékok szintézise.

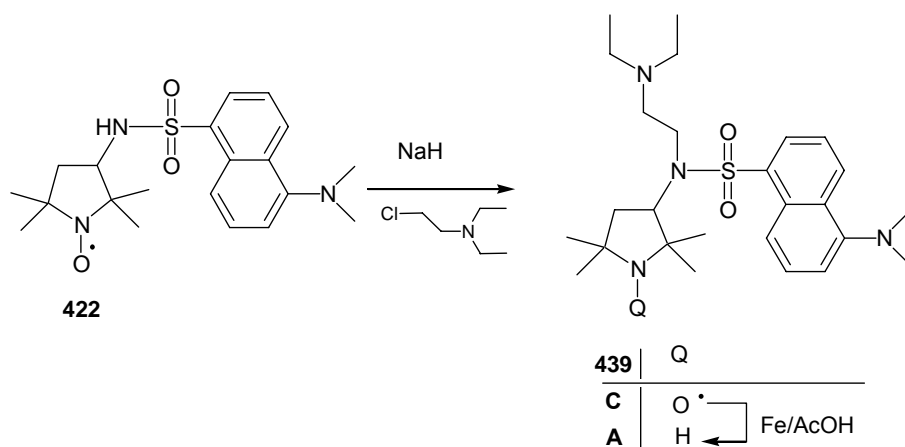


82. ábra: A **432A** (DanePy) vegyülettel infiltrált dohánylevél pásztázó lézer mikroszkóppal felvett fluoreszcencia képe a stressz kezelés előtt (0') illetve 45 perces fotoinhibíciós kezelés után (45'). A vörös, 650 nm felett detektált fluoreszcencia (felső sor) a klorofillból származik, míg a zöld (505-550 nm-es) emisszió a DanePy-ből származik. (Gerjesztés: 351 nm mindkét esetben, kép méret 35 x 35  $\mu\text{m}$ , az optikai metszet a levél felszínétől 35  $\mu\text{m}$  távolságban, az ún. mezofill sejtekről készült.) A zölden és vörösén fluoreszkáló képpontok egybeesése azt bizonyítja, hogy a DanePy bejutott a sejtekbe és ezen belül a klorofill tartalmú kloroplasztiszokba.

A danzilezett nitroxidszármazékok sikere ösztönzött bennünket arra, hogy részletesebben megvizsgáljuk, hogy a donor-akceptor összekötő lánc megváltoztatása hogyan befolyásolja a fluoreszcencia intenzitás változását. Ennek megfelelően a fluorofort és a gyökké oxidálódó amint a **432A**-hoz képest hosszabb illetve rövidebb összekötő láncsal kapcsoltuk össze. Kísérleteinkhez a **10** allil-bromidból előállított **433** piperazingyűrűt tartalmazó amint és a **437** aminoetil-piperazingyűrűt tartalmazó amint használtuk. Ezeket danzilezve jutottunk a **435C** és **438C** vegyületekhez. Ezek vaspor/jégecetes redukciója a **435A** és **438A** vegyületeket adta (83. ábra). A rövid összekötőláncot tartalmazó vegyület előállításához a **422** vegyület szulfonamid nitrogénjének alkilezésével jutottunk **439C** vegyülethez, amit vaspor/jégecettel redukálva a **439A** vegyületet kaptuk (84. ábra).<sup>xxvi</sup>



83. ábra: Különböző összekötőlánc hosszúságú dantilezett nitroxidszármazékok szintézise



84. ábra: Az összekötőlánc nélküli, bázisos oldalláncot tartalmazó dantilezett nitroxidszármazékok szintézise.

Összehasonlítottuk az előállított danzilezett nitroxidszármazékok gyökös „C” és diamágneses „A” formáinak emissziós maximum értékeit és a csúcsok maximumának arányát (7. táblázat).

**7. Táblázat:** A danzil fluoroforhoz kapcsolt nitroxidok és sztérikusán gátolt aminoszármazékaik fluoreszcens emissziós adatai.

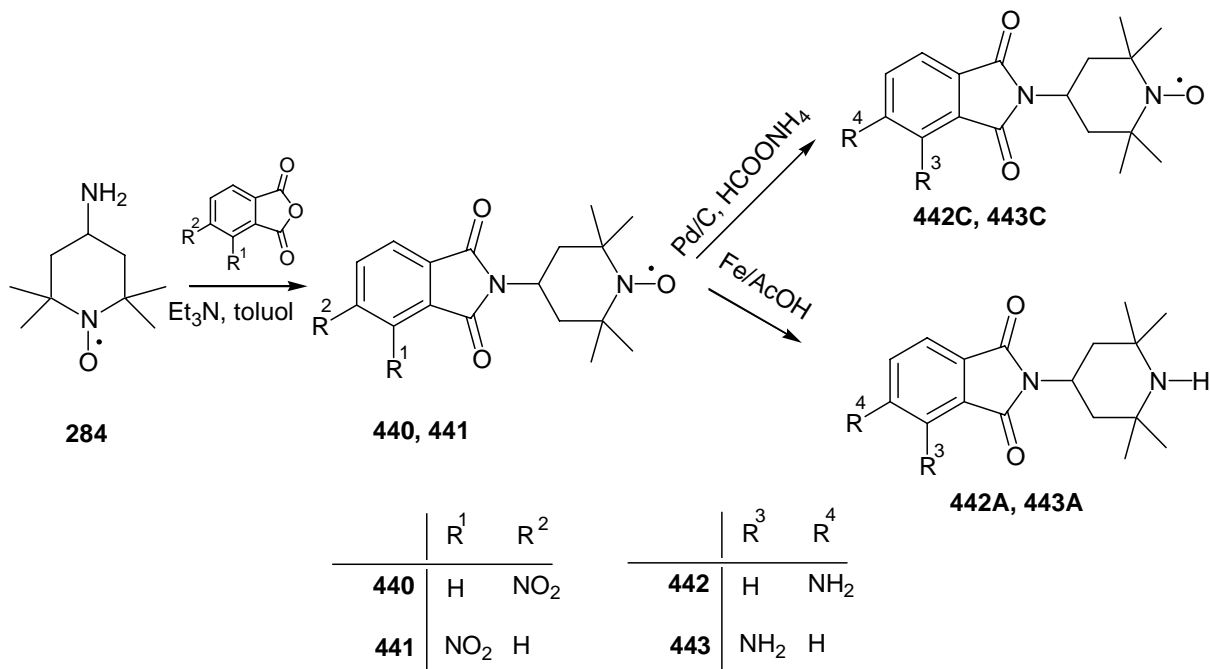
Vegyület	„C forma” emissziós maximuma (nm)	„A forma” emissziós maximuma (nm)	A/C forma emissziós intenzitásának aránya
<b>431</b>	540	550	6,39
<b>432</b>	530	551	5,56
<b>435</b>	560	556	1,57
<b>438</b>	545	550	1,10
<b>439</b>	519	523	28,13

A 7. táblázat adataiból kitűnik, hogy a **439** vegyületnél a legkedvezőbb az arány a diamágneses és a paramágneses forma emissziós intenzitása szempontjából. Azonban a **431** és **432** vegyületek paramágneses és diamágneses formáinak mindössze hatszoros fluoreszcencia intenzitás különbségét ellensúlyozza a **431A** vagy **432A** vegyületekből ROS hatására képződő **431C** vagy **432C** pirrolin nitroxidot tartalmazó vegyületek nagyobb stabilitása a telített, pirrolidin nitroxidot tartalmazó vegyülethez (**439C**) képest.<sup>10</sup>

#### ***Aminoftálimid-származékok szintézise***

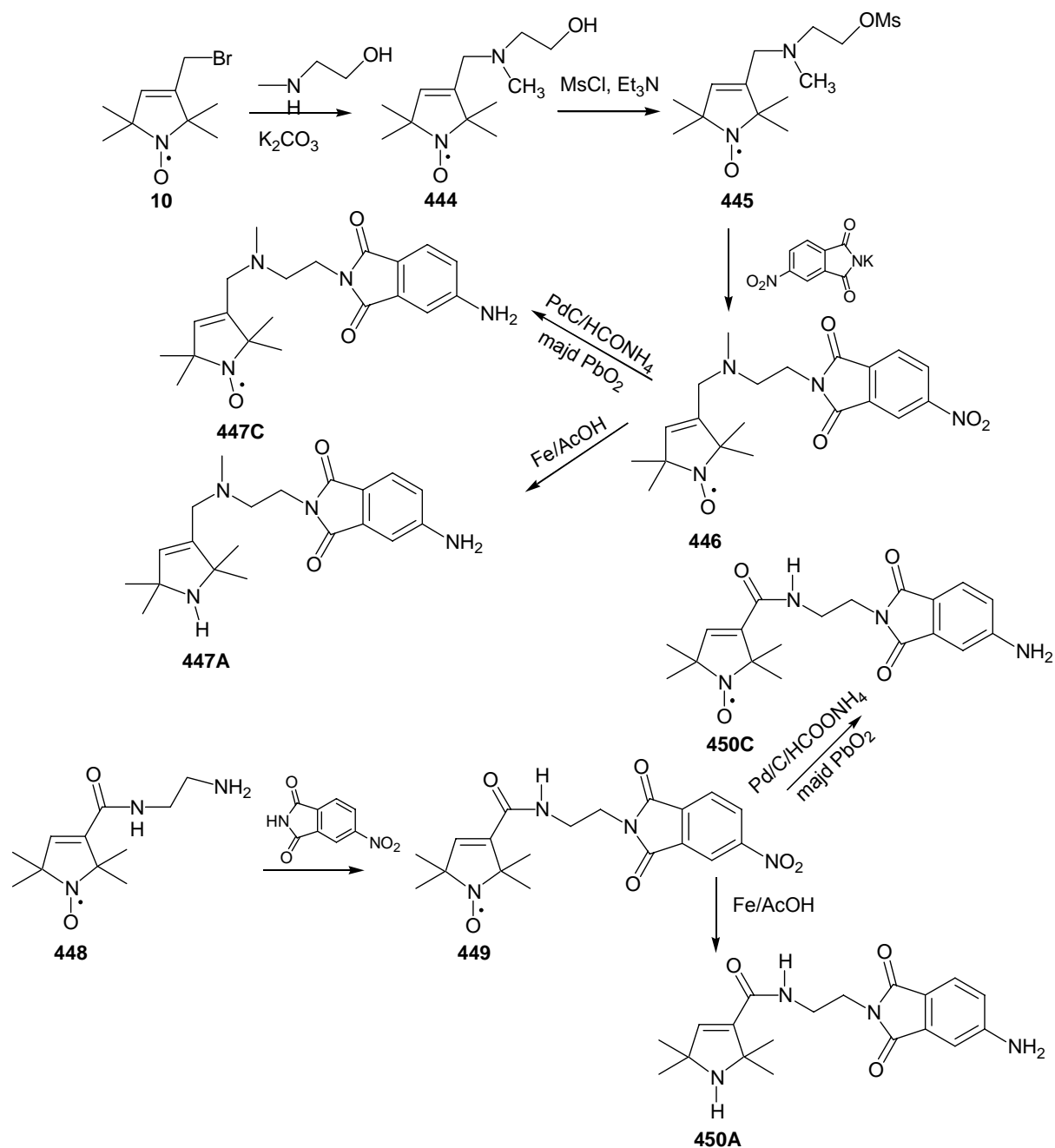
A danzilcsoporton kívül más fluoroforok beépítésével is próbálkoztunk. A ROS csapdázásán alapuló hatású, ftálimidet tartalmazó kardioprotektív gyógyszerjelölt<sup>118</sup> alapján kézenfekvőnek tűnt a fluoreszcens aminoftálimid-származékok kipróbálása. Ezek a származékok pl. 3- v. 4-nitroftálsavanhidridből érhetők el a megfelelő paramágneses aminokkal, pl. **284**-gyel reagáltatva, majd a kapott **440**, **441** nitroszármazékot vaspapor/jégeg-cettel redukálva a **442A**, **443A** diamágneses aminoftálimid-származékokhoz jutottunk 10-22%-os össztermeléssel, míg Ehrenkaufér-módszerrel redukálva, majd a hidroxilamint PbO<sub>2</sub>-dal oxidálva a paramágneses **442C**, **443C** származékokat kaptuk 8-16%-

os össztermeléssel. A **443A** diamágneses és a **443C** paramágneses vegyületek fluoreszcencia intenzitása között mintegy 25-szörös különbséget találtunk (85. ábra).<sup>XXVI</sup> A **440** és **441** vegyületek egyúttal modellként szolgáltak a nitrocsoport Ehrenkaufér-módszerrel történő szelektív redukciójára is nitroxid jelenlétében.



85. ábra: Paramágneses és diamágneses aminosftálimid-származékok szintézise

Olyan vegyületeket is elő kívántunk állítani amelyekben az aminosftálimid és a nitroxid között az összekötőlánc hosszabb volt. Ezt indiai kutatók azon megfigyelése is inspirálta, hogy az *N*-dimetilamino-etil-4-aminosftálimid a fotoindukált elektrontranszfer miatt Fe<sup>3+</sup> ionok hatására fluoreszcencia serkentést mutat.<sup>187</sup> A **10** allil-bromiddal az *N*-metil-etanolamint reagáltatva a **444** alkoholt kaptuk, ennek mezilátjával (**445**) alkilezve a 4-nitrosftálimidet kaptuk a **446** vegyületet. A nitrocsoport szelektív redukciójával a **447C** vegyülethez, míg a vaspór/jégecetes redukcióval a **447A** triaminhoz jutottunk 4 lépés után 15%-os termeléssel. Spektroszkópiai összehasonlítás céljából a **448** aminoetil-savamidból és a 4-nitrosftálimidből 35%-os össztermeléssel a **450C** és **450A** savamidokat is előállítottuk (86. ábra).<sup>XXVII</sup>



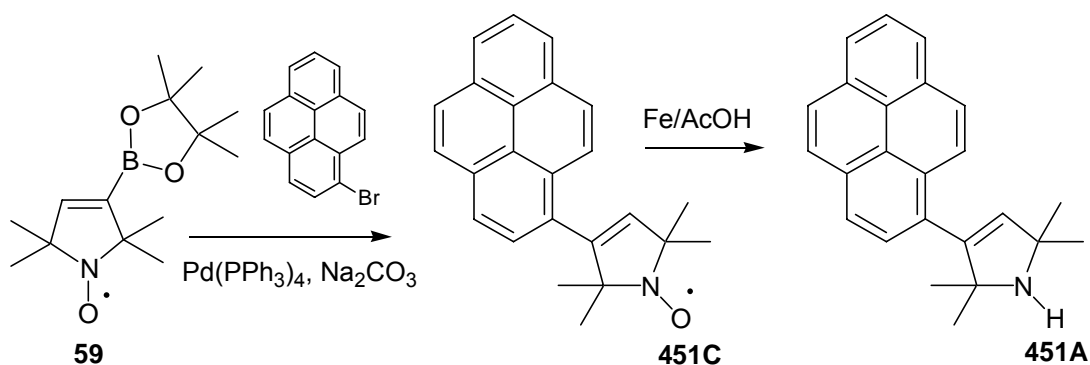
86. ábra: Paramágneses és diamágneses, négy atomos (3C+N) összekötőlánccal rendelkező aminiophthalimid-származékok szintézise.

Az így előállított paramágneses **447C**, **450C** és a diamágneses **447A**, **450A** származékok fluoreszcencia intenzitása közötti különbség mindössze kétszeres volt. Ezeket a vegyületeket 367 nm-en gerjesztve, acetonitrilben 470 nm-en fluoreszkáltak. A diamágneses **447A** származékhoz savat vagy fémiont ( $\text{Fe}^{3+}$ ) adva a fluoreszcencia intenzitás négyszeresére nő. Ez a hatás a fotoindukált elektrontranszfer gátlásával magyarázható, ami az összekötőlánc bázisos nitrogénatomjának nemkötő elektronpárja és a szingulett állapotban levő fluorofor között jön létre, ha előbbi nem protonálódott vagy

nem képzett fémionnal komplexet.<sup>188</sup> A fémion hatására bekövetkező serkentést nem észleltük sem a **450A** savamid származéknál, ahol a láncközi nitrogén nem bázisos, és **447C** vegyületnél sem, ahol a nitroxid kioltó hatása a domináns. A **447A** és **447C** vegyületek alapját képezhetik az oxidáción-redukción ill. fémion komplexáláson alapuló optikai logikai kapuknak.<sup>189</sup>

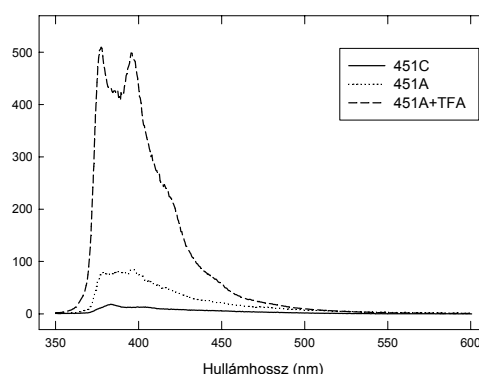
### *Paramágneses és diamágneses pirénszármazékok szintézise*

A paramágneses pirénszármazékokat C-C kötés kialakításával szintetizáltuk. Az **59** paramágneses boronsavat 1-brómpirénnel reagáltatva Suzuki-reakcióban a **451C** vegyületet kaptuk 42%-os termeléssel. Ezt a vegyületet vaspör/jégecettel redukálva a **451A** amint kaptuk 36%-os hozammal (87. ábra)<sup>VI</sup>



87. ábra: Paramágneses és diamágneses pirénszármazékok szintézise

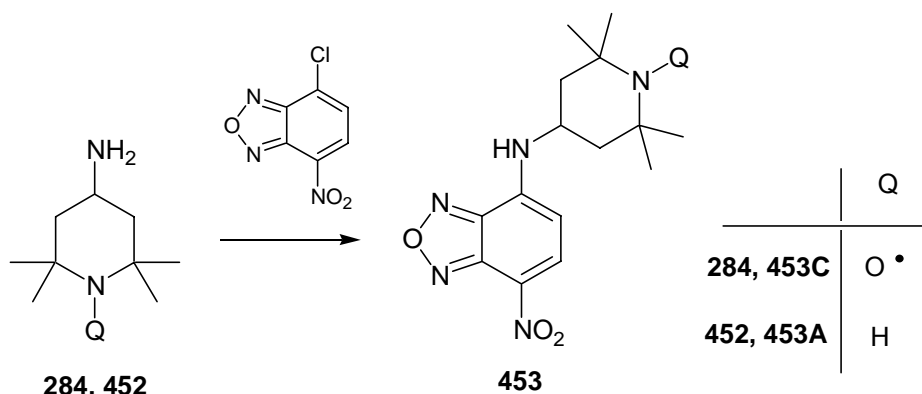
A **451A** vegyület ROS hatására **451C** alacsony fluoreszcencia intenzitású, paramágneses vegyületet adja, ugyanakkor **451A** vegyület protonálódás hatására mintegy hatszoros serkentést mutat (88. ábra). Ennek oka, hogy **451A** vegyületben is fellép a fotoindukált elektrontranszfer, amely a szekunder amin protonálódásával megszűnik, így a pirén fluoreszcenciája felerősödik.



88. ábra: A **451C** (9.8  $\mu\text{M}$ ), **451A** (9.8  $\mu\text{M}$ ) és **451A** (9.7  $\mu\text{M}$ ) + TFA (150 mM) fluoreszcencia spektruma acetonitrilben 24 °C-on,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 341 nm.

### Paramágneses és diamágneses 4-nitrobenzofurazán-származékok szintézise

A 4-nitrobenzofurazánon alapuló kettős szenzor vegyületeket a **284** paramágneses aminból vagy a **452** 4-amino-2,2,6,6-tetrametil-piperidinből és a 7-klór-4-nitrobenzofurazán aromás nukleofil szubsztitúciós reakciójával<sup>190</sup> állítottuk elő 78-83%-os termeléssel (89. ábra). A kapott diamágneses **453A** és a paramágneses **453C** vegyületek közötti fluoreszcencia intenzitás különbsége mintegy 33-szoros. Ezeket a vegyületeket 470 nm körül gerjesztve az emissziójuk, hasonlóan a danzilszármazékokhoz, 530 nm körül jelentkezik.<sup>XXVIII</sup>

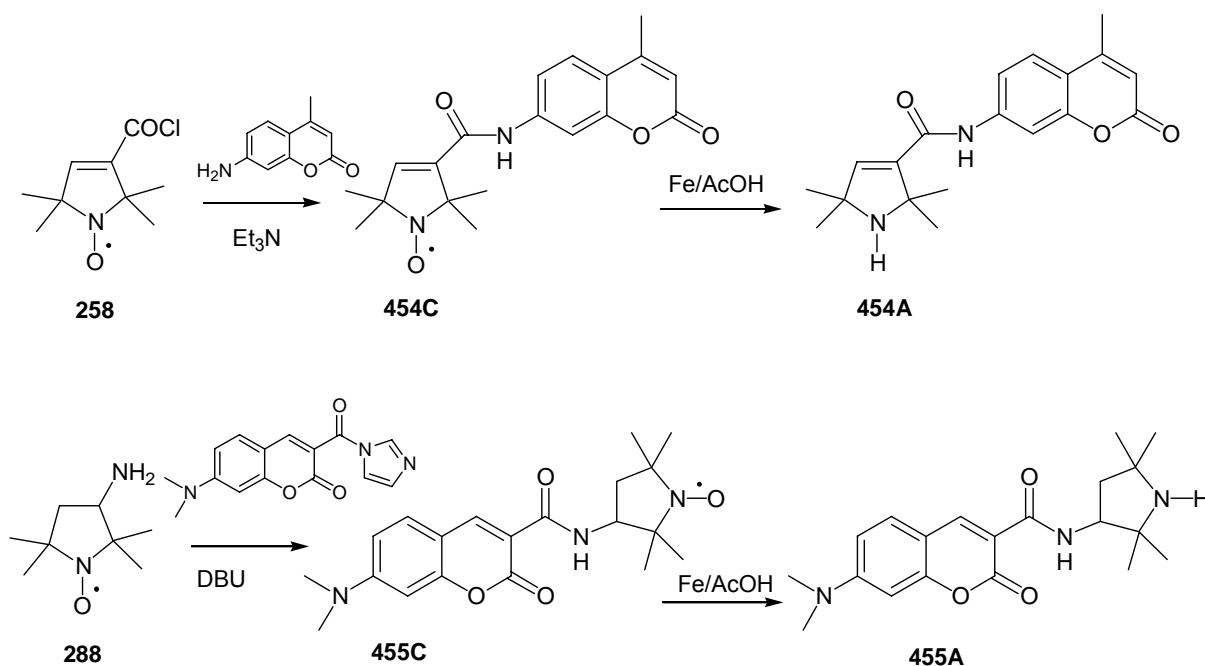


89. ábra: A 4-nitrobenzofurazánon alapuló kettősen jelölő reagensek szintézise

### A paramágneses és diamágneses kumarinszármazékok szintézise

A kumarinszármazékok szintézisének kézenfekvő volt a kedvezőbb fluoreszcencia sajátosságokkal rendelkező 7-aminokumarin-származékokból kiindulni. A 4-metil-7-aminokumarint **258** savkloriddal acileztük, majd a kapott **454C** vegyületet vaspor/jégeccel a **454A** vegyületté redukáltuk. Ezen vegyületek diamágneses és paramágneses párja között mindössze 10% emissziós intenzitásbeli különbséget tapasztaltunk acetonitrilben. Ezt a **454A** vegyületnél fellépő intramolekuláris töltésátvitel következtében fellépő fluoreszcencia kioltással magyaráztuk. További hátrány volt a **454** vegyületek alacsony gerjesztési (322 nm) és emissziós (382 nm) hullámhossza. Ezért a 7-dimetilamino-3-karboxikumarint<sup>191</sup> választottuk fluoroformnak és a **288** amint a kumarin 3-karboxilcsoportjához kapcsoltuk acilezéssel, 55%-os termeléssel. A kapott **455C** vegyületet ezután vaspor/jégeccel redukcióval **455A** vegyületté alakítottuk 38%-os hozammal (90. ábra). A **455C** és **455A** vegyületek fluoreszcenciája között 25-szörös különbséget tapasztaltunk és a gerjesztési (413 nm) és az emissziós (462 nm) hullámhosszak is kedvezőbbek voltak a **454A** és **454C** kumarinszármazékokhoz képest.<sup>XXVIII</sup>



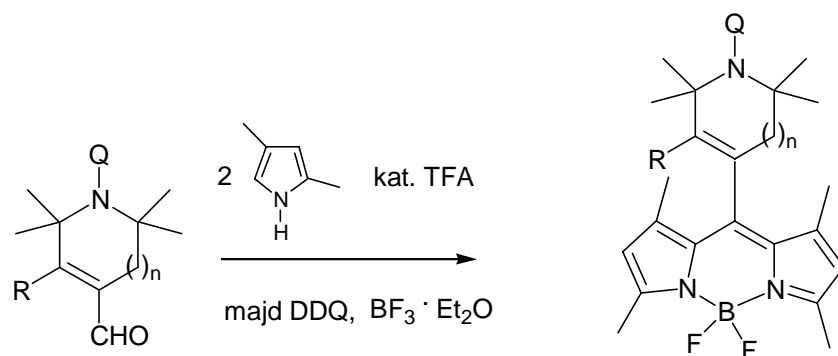


90. ábra: Paramágneses és diamágneses kumarinszármazékok szintézise

#### **Paramágneses és diamágneses BODIPY-származékok szintézise**

A 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén-származékok (BODIPY) szintézisét Haugland és munkatársai dolgozták ki.<sup>192</sup> Ennek a fluoroformnak az a nagy előnye, hogy nem érzékeny a közeg pH változásaira, az oldószerek polaritására, nagy a moláris abszorpciós együtthatója és a gerjesztési/emissziós hullámhossz a pirrolgyűrűk szubsztituenseinek változtatásával variálható (500-800 nm).<sup>193</sup> Hátránya ennek a típusú dipirrol-metán festéknek az alacsony vízdoldhatósága és a gerjesztési és az emissziós hullámhosszak közötti kis (15-20 nm) különbség. A BODIPY-származékok szintézise savkatalizált kondenzációs reakción alapszik és a pirrolgyűrű fokozott reakciókészségét használja ki aromás elektrofil szubsztitúciós reakcióban.<sup>194</sup>

A **9**, **292**, **14**, **37** és **250** aldehideket metilénkloridban reagáltatva 2 ekvivalens 2,4-dimetil-pirrollal trifluorecetsav (TFA) katalizált folyamatban, majd a DDQ-val történő aromatizáció és az azt követő bórtrifluorid-éterátos reakció a **456C**, **456A**, **457**, **458**, **459** vegyületeket adta 9-35%-os termeléssel (91. ábra, 8. táblázat).<sup>XXIX</sup>



**9, 292, 14, 37, 250**

**456A, 456C, 457, 458, 459**

91. ábra: Paramágneses és diamágneses BODIPY-származékok szintézise

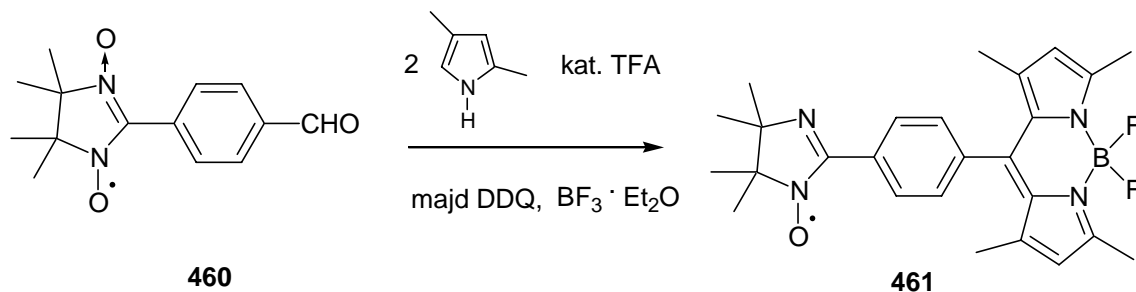
**8. Táblázat:** A paramágneses és diamágneses BODIPY-származékok spektrális sajátosságai.

Aldehid	BODIPY-származék	n	R	Q	$\lambda_{em}/\lambda_{ex}$ dioxán	$\lambda_{em}/\lambda_{ex}$ acetonitril	$\Phi$
<b>9</b>	<b>456C</b>	0	H	O·	518/542	515/540	0,01
<b>292</b>	<b>456A</b>	0	H	H	512/538	510/533	0,21
<b>14</b>	<b>457</b>	1	H	O·	512/523	498/509	0,03
<b>37</b>	<b>458</b>	0	Br	O·	517/540	515/532	0,02
<b>250</b>	<b>459</b>	0	H	OAc	514/536	510/530	0,54

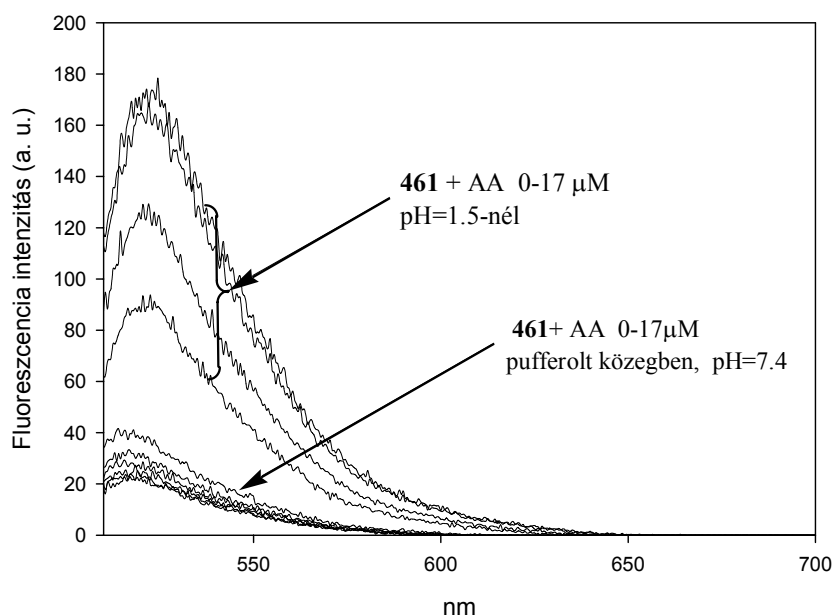
A 8. táblázatból kitűnik, hogy a poláris és az apoláris oldószerben mért gerjesztési és emissziós hullámhosszak csak kis mértékben különböznek egymástól. A **456C**, **457**, **458** paramágneses vegyületek fluoreszcenre vonatkoztatott kvantumhatásfoka ( $\Phi$ ) meglehetősen alacsony, ugyanakkor **459** és **456A** diamágneses vegyületek erősen fluoreszkálnak. A **459** vegyület erősebb fluoreszcenciája annak tulajdonítható, hogy **456A** vegyületnél is fellép a fotoindukált elektrontranszfer (PET) folyamat a pirrolinegyűrű nitrogénatomjának nemkötő elektronpárja és a BODIPY fluorofor  $\pi$ -elektronrendszere között. Ez egy oxidatív PET folyamat, ugyanis sav és  $Zn^{2+}$  ionok hatására a fluoreszcencia mintegy harmadára csökken. Hasonló jelenséget figyeltek meg 2,2'-dipiridilhez kapcsolt BODIPY-származékok esetében is.<sup>195</sup> A **459** és a **456C** között fellépő ötvenszeres különbség annak tulajdonítható, hogy **456C** esetében a legerősebb a fluoreszcencia kioltás, mert a nitroxid és a fluorofor itt van egymáshoz a legközelebb, hiszen a pirrolinegyűrű kettős kötése a konjugáció révén részese a BODIPY festékmolekula  $\pi$ -elektronrendszerének.

Érdekes feladat volt a BODIPY festékmolekula és a nitronil-nitroxid összekapcsolása. A **460** vegyületet<sup>196</sup> a 2,4-dimetil-pirrollal reagáltatva savkatalizált körülmények között, majd a DDQ-s oxidációt és a bórtrifluoriddal történő kezelést követően **461**

iminonitroxidhoz jutottunk (92. ábra).<sup>xxx</sup> Ez a vegyület az irodalmi áttekintésben már említett **428** pirénavázis iminonitroxid-származékhoz hasonló sajátságokat mutatott. A nitroxid redukciója aszkorbinsavval (AA) és az iminonitrogén egyidejű protonálása eredményez csak intenzív fluoreszcenciát (93. ábra).



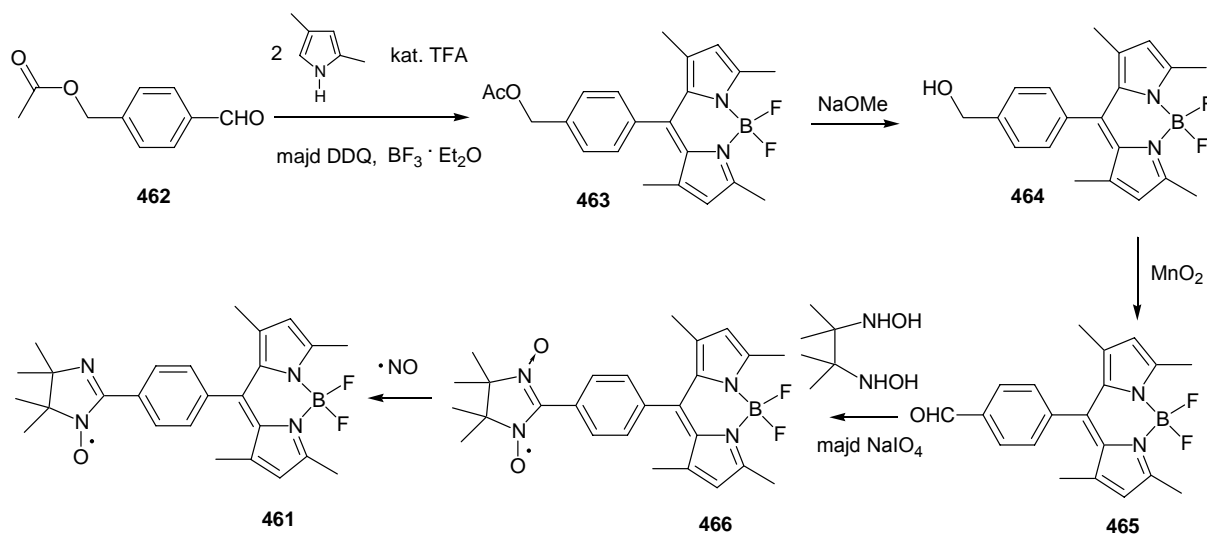
92. ábra: A BODIPY festékmolekulához kapcsolt iminonitroxid szintézise.



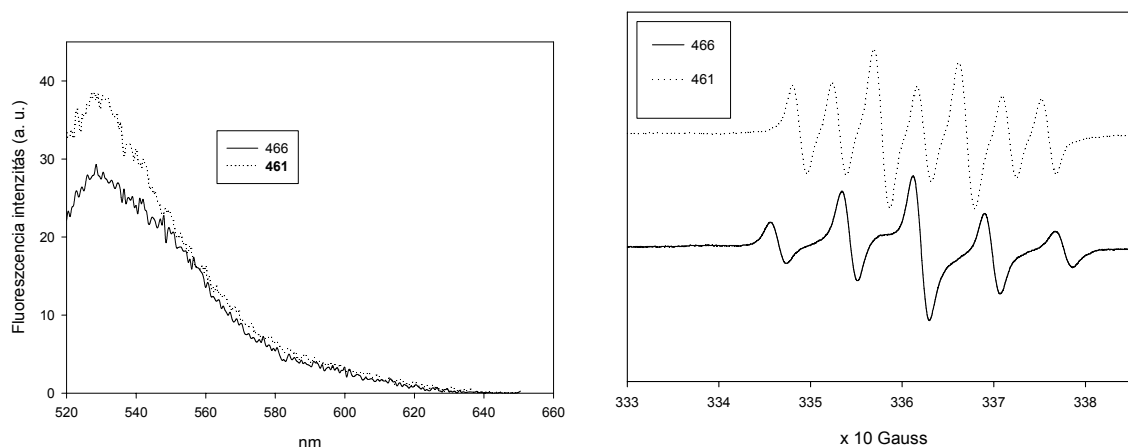
93. ábra: A **461** molekula ( $15\mu\text{M}$ ) fluoreszcencia intenzitásának változása aszkorbinsavval (AA) történő redukció hatására pufferolt ill. savas közegben.

A BODIPY-származékhoz kapcsolt, nitrogén-monoxid kimutatására<sup>197</sup> alkalmas fluoreszcens nitronil-nitroxid szintéziséhez<sup>198</sup> olyan utat kellett választani, ahol a nitroxid-gyűrű kialakítása csak az utolsó lépésben történik meg. A tereftálaldehid egyik leendő aldehidcsoportját redukált formában acilezve kaptuk **462** vegyületet, majd ebből alakítottuk ki 3 lépésben a **465** fluoreszkáló benzaldehidet. Ezt a 2,3-dimetil-2,3-dihidroamilamino-butánnal reagáltatva, majd az azt követő nátrium-metaperjodátos oxidációval 38%-os hozammal jutottunk **466** nitronil-nitroxidhoz (94. ábra).<sup>xxx</sup> A **466** vegyület nitrogén-monoxidot csapdázva a **461** vegyületté alakul, de a bekövetkező

fluoreszcencia növekedéshez (kb. 20%) képest diagnosztikusabb értékű az ESR spektrumban bekövetkező változás (95. ábra).



94. ábra: Nitronil-nitroxidhoz kapcsolt BODIPY-festékmolekula szintézise.



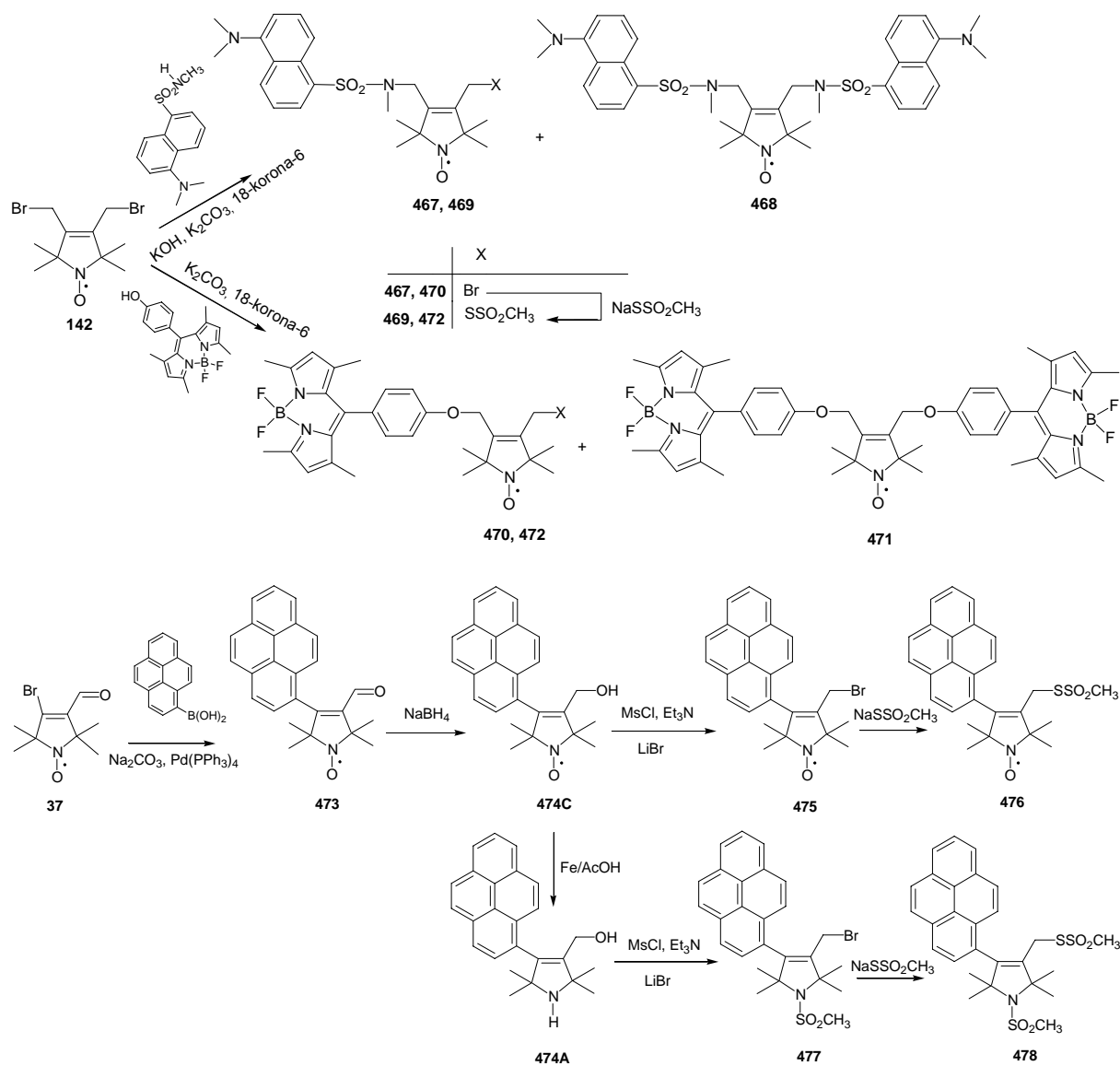
95. ábra: A **466** vegyület fluoreszcenciájának és ESR spektrumának változása nitrogén-monoxid hatására.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a kettősen jelölő vegyületek érzékenysége (azaz a diamágneses és paramágneses vegyületek fluoreszcenciája közötti különbség) annál nagyobb, minél közelebb van egymáshoz a donor és az akceptor. A vízdékonyságot növelő csoportok beépítése kedvezően befolyásolhatja a ROS csapdázására használt vegyület biológiai rendszerben való alkalmazhatóságát, azonban kellő óvatossággal kell eljárni, nehogy a biológiai rendszerben bekövetkező protonálódás vagy fémion komplexálás révén megszűnő PET téves információkhoz vezessen. Körültekintően kell eljárni a fluoroforokhoz kapcsolt szterikusan gátolt aminok (**A** forma) alkalmazásakor is, hiszen itt is felléphet PET vagy

töltésátmenettel járó folyamat, ami a várakozással szemben, eleve csökkentett fluoreszcenciát eredményez.

### 5.2.2. A kettősen jelölő vegyületek szintézise

A kettősen jelölő vegyületek abban különböznek az előző alfejezet szenzor vegyületeitől, hogy a nitroxidot egy SH-specifikus, reagáló csoporttal is elláttuk. Az elgondolásunk az volt, hogy a fehérjét hely- és funkcióspecifikusan egyszerre módosítsuk egy fluoreszcens és egy spinjelző reagenssel azért, hogy az ESR és a fluoreszcenciás anizotrópia vizsgálatokból több információt szerezhessünk a fehérje szerkezetére és működésére vonatkozóan. Az elgondolás fő problémája, hogy a dinamikus mechanizmusú kioltás következtében a fluorofor élettideje mintegy tizedére csökken, így a maximum 1-2 ns-os időablak miatt kevés molekuláris történés vizsgálható fluoreszcens anizotrópiás technikával. Az *N*-metil-danzilamidot<sup>199</sup> alkileztük a **142** dibromvegyülettel, majd a kapott **467** vegyületet továbbalakítottuk **469** metántioszulfonáttá.<sup>1</sup> A **469** vegyület 1,2 ns fluoreszcens élettidejével rendelkezett acetonitrilben. A fluoreszcens élettidőt sikerült növelni, amikor a donor-akceptor távolságot növeltük, pl. a **142** vegyülettel a BODIPY-fenolszármazékot<sup>200</sup> alkileztük és a **470** bromvegyületből nyert **472** metántioszulfonátot állítottuk elő. A **472** vegyület fluoreszcens élettideje acetonitrilben 2,5 ns volt.<sup>xxx</sup> A módszer hátránya, hogy melléktermékként **468** ill. **471** vegyületek is keletkeztek az alkilezés során, így **469**, **472** célvegyületek hozama 6-15% volt. A fluoreszcens élettidő növelésében akkor sem értünk el eredményt, ha a köztudottan hosszú fluoreszcens élettidejű pirénygyűrűt használtuk fluoroforként. A pirén-1-boronsavat **37** aldehiddel reagáltattuk Suzuki-reakcióban, majd **473** aldehidet **474C** alkoholon és **475** bromvegyületen keresztül **476** metántioszulfonáttá alakítottuk. Az így nyert vegyület fluoreszcens élettideje mindössze 0,7 ns volt. Ezért **474C** alkoholt **474A** diamágneses vegyületté alakítottuk és a pirrolingyűrű nitrogénjét szulfonamidként védve (fotoindukált elektrontranszfer okozta anomáliákat és a szintetikus nehézségeket kiküszöbölendő) meziláton keresztül a **477** bromvegyületet állítottuk elő. Ebből készítettük a **478** diamágneses metántioszulfonátot, amelynek fluoreszcens élettideje 2,9 ns volt (96. ábra).<sup>xxviii</sup> A szimultán fluoreszcens és spinjelölés nehézségeinek lehetséges feloldása, hogy a fehérje ugyanazon helyét módosítjuk egy paramágneses, majd utána egy fluoreszkáló diamágneses, csaknem hasonló szerkezetű ill. alakú molekulával, mint pl. **476** és **478** vegyületek. Az így kapott ESR, valamint a fluoreszcencia spektroszkópiával nyert információk reményeink szerint jól hasznosíthatók a fehérjemolekula szerkezetének és funkciójának felderítésére.

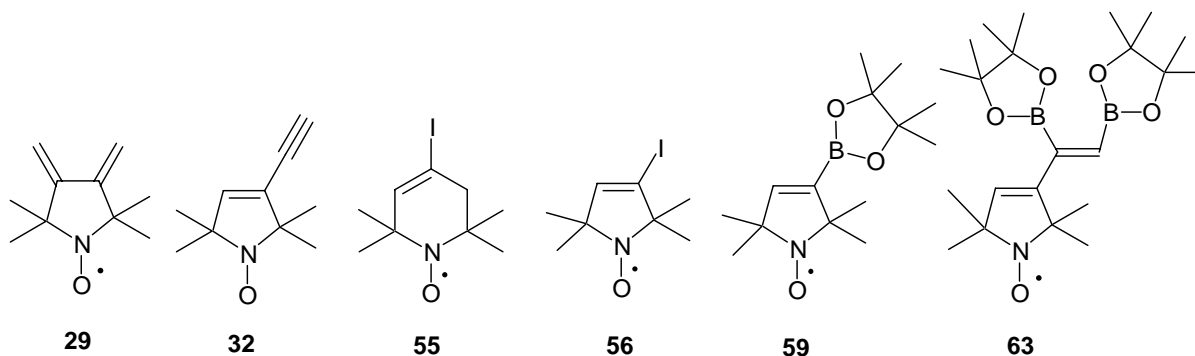


96. ábra: Kettősen (spin és fluoreszcens) jelölő vegyületek szintézise.

## 6. Összefoglalás

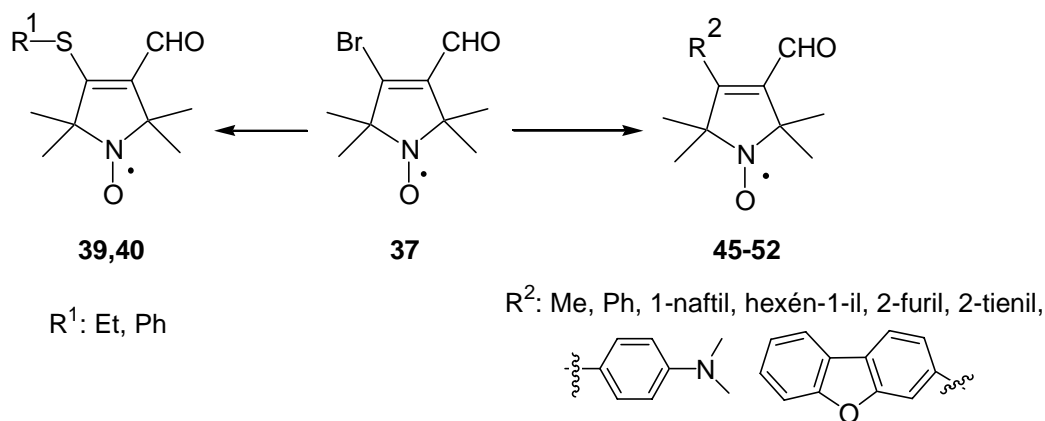
Az elsősorban preparatív szerves kémiai munkán alapuló kutatások számos új nitroxidszármazék előállítását eredményezték. Az értekezés sokoldalúan hasznosítható nitroxid intermedierek előállítását és ezek felhasználásával, valamint az új szintézisutakkal kapott spinjelzők, pirrolin nitroxidot tartalmazó gyűrűvázak, paramágnesesen módosított biomolekulák és a kettős (fluoreszcens és spin) szenzorvegyületek szintézisét tárgyalja. A biológiai alkalmazásokon túl célunk volt annak a felderítése, hogy a nitroxidok jelenlétében, azok irreverzibilis károsodása nélkül milyen kémiai reakciók valósíthatók meg. Az értekezésben leírt és az ebben a fejezetben összefoglalt eredmények egy részét a 2005-ben megjelent összefoglaló dolgozatunk is tárgyalja.<sup>201</sup>

Célunk volt a sokoldalúan felhasználható paramágneses intermedierek szintézise; így a Diels-Alder-reakcióban alkalmazott szimmetrikus paramágneses dién (**29**), a Pd-katalizált keresztkapcsolási reakciókban alkalmazható **32** acetilénvegyület, **55** és **56** jódvegyületek és **59**, **63** paramágneses vinil-boronsavak (97. ábra). Ezen vegyületek jelentősége abban rejlik, hogy a nitroxid irreverzibilis károsodása, ill. sok esetben megvédése nélkül adnak lehetőséget a C-C kötés kialakítására.



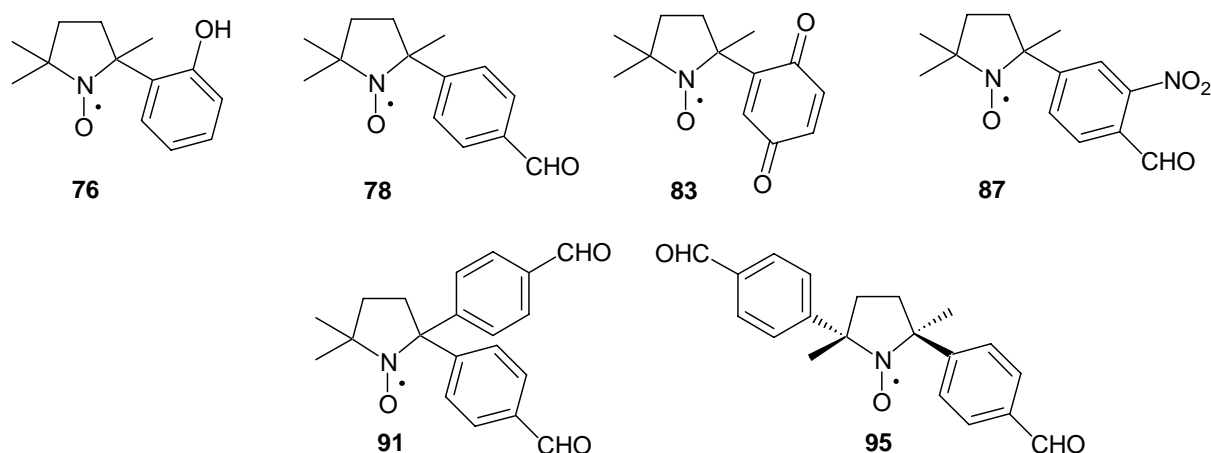
97. ábra: A fontosabb, újonnan előállított kulcsvegyületek

Eljárást dolgoztunk ki a korábban ismert **37**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítlen aldehidből szén-kén ill. szén-szén kötés kialakításával 3,4-diszubsztituált pirrolin nitroxidok előállítására. Az előállított **39**, **40** és **45-52** aldehidek további reakciók fontos kiindulási vegyületeinek bizonyultak (98. ábra).



98. ábra: A fontosabb 3,4-diszubsztituált pirrolin nitroxid intermedierek

A nitronokból és a megfelelően védett aril-Grignard-reagensekből, majd az aromásgyűrű utólagos továbbalakításával változatos szerkezetű 2-szubsztituált pirrolidin nitroxidok (pl. **76**, **78**, **83**, **87** stb.) szintézisét dolgoztuk ki. A megfelelő nitronból kiindulva 2,2- és 2,5-diszubsztituált, tovább módosítható **91** és **95** pirrolidin nitroxidokat állítottunk elő (99. ábra).

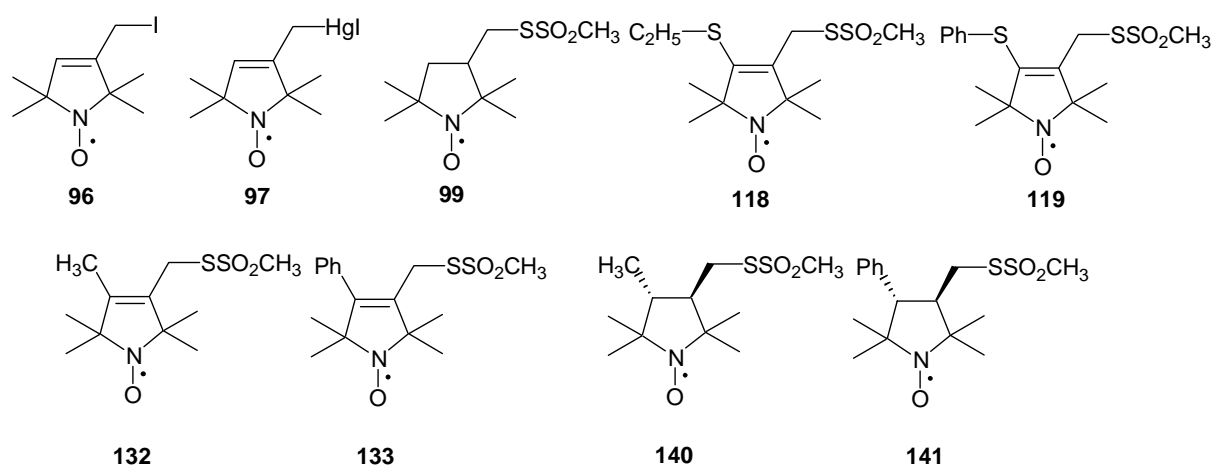


99. ábra: Az újonnan szintetizált fontosabb 2-, 2,2- és 2,5-diszubsztituált pirrolidin nitroxidok

A széleskörben ismert és a cisztein pontmutánsok jelölésére alkalmazott metántioszulfonát **11** (HO-225) reagenst kívántuk továbbfejleszteni. Elsőként a metántioszulfonát szubsztituens helyett más tiolspecifikus reagenseket állítottunk elő, pl. jód (**96**), higany-jodid (**97**) reagenseket, valamint a nitroxidgyűrű telítettségén változtattunk (**99**). A másik lehetőség a **11** továbbfejlesztésére egy további szubsztituens beépítése volt a pirrolingyűrű négyes szénatomjára. Így a **39**, **40**, **45**, **46** vegyületekből a 3-metántioszulfonát-4-szubsztituált monofunkcionális, SH-specifikus pirrolin nitroxidokat **118**, **119** és **132**, **133**

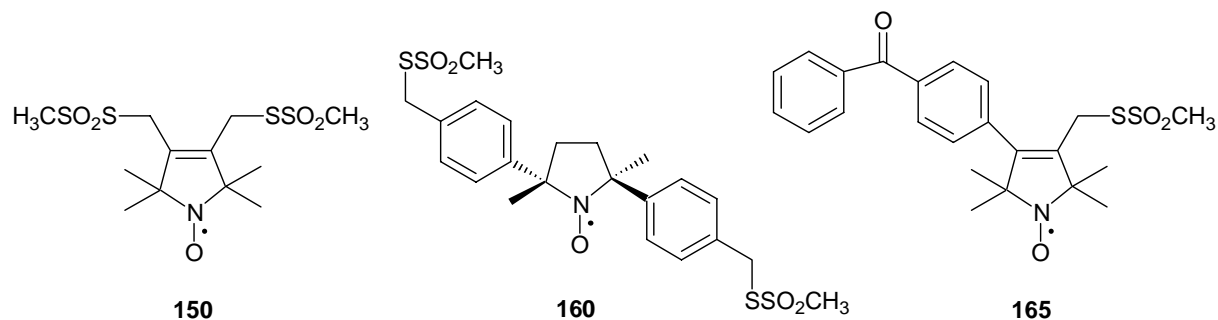


állítottuk elő. A megfelelő telített származékokat (**140**, **141**) Grignard-reagens  $\alpha,\beta$ -telítetlen-észterre történő konjugált addíciójával nyertük (100. ábra). Ezeket a vegyületeket T4 lizozim cisztein pontmutánsain tesztelték. A telített vegyületek inkább az oldalláncok között fellépő másodlagos kölcsönhatások vizsgálatára alkalmasak, míg a telítetlen vegyületek, különösen a nagy térkitöltésű szubsztituenst hordozó **133**, a fehérjelánc konformációs mozgását képesek követni.



100. ábra: Néhány fontosabb új, monofunkcionális, tiolspecifikus spinjelző reagens.

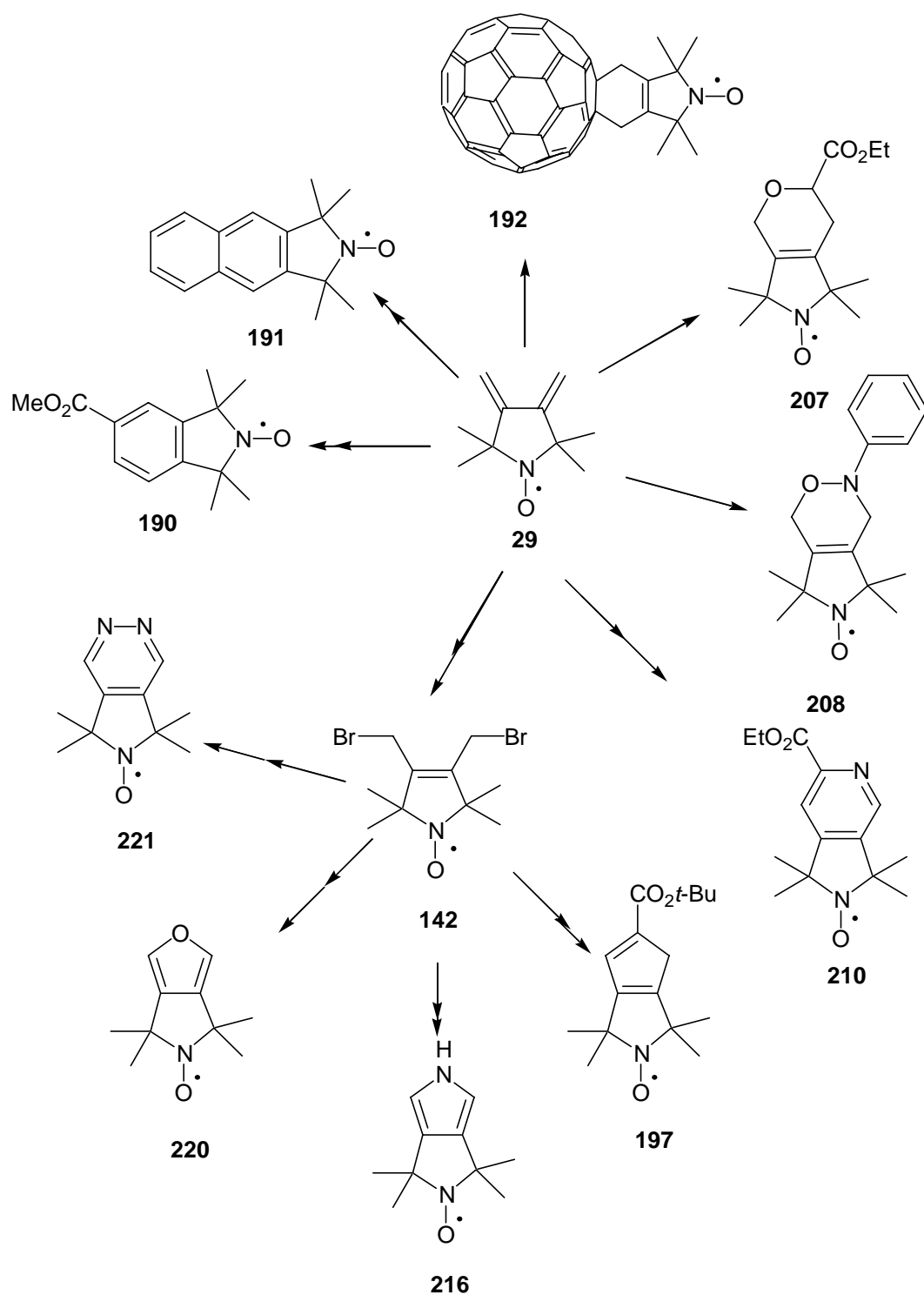
Új, homobifunkcionális, cisztein oldalláncok közötti intra- ill. interhelikális keresztkötés kialakítására alkalmas spinjelző vegyületek (**150**, **160**) szintézisét dolgoztuk ki. A **165** tiolspecifikus és fotoaktiválással keresztkötés kialakítására alkalmas vegyületet a Suzuki-reakció segítségével 4 lépésben tudtuk előállítani (101. ábra).



101. ábra: Néhány fontosabb, újonnan előállított, tiolspecifikus, keresztkötő spinjelző reagens.

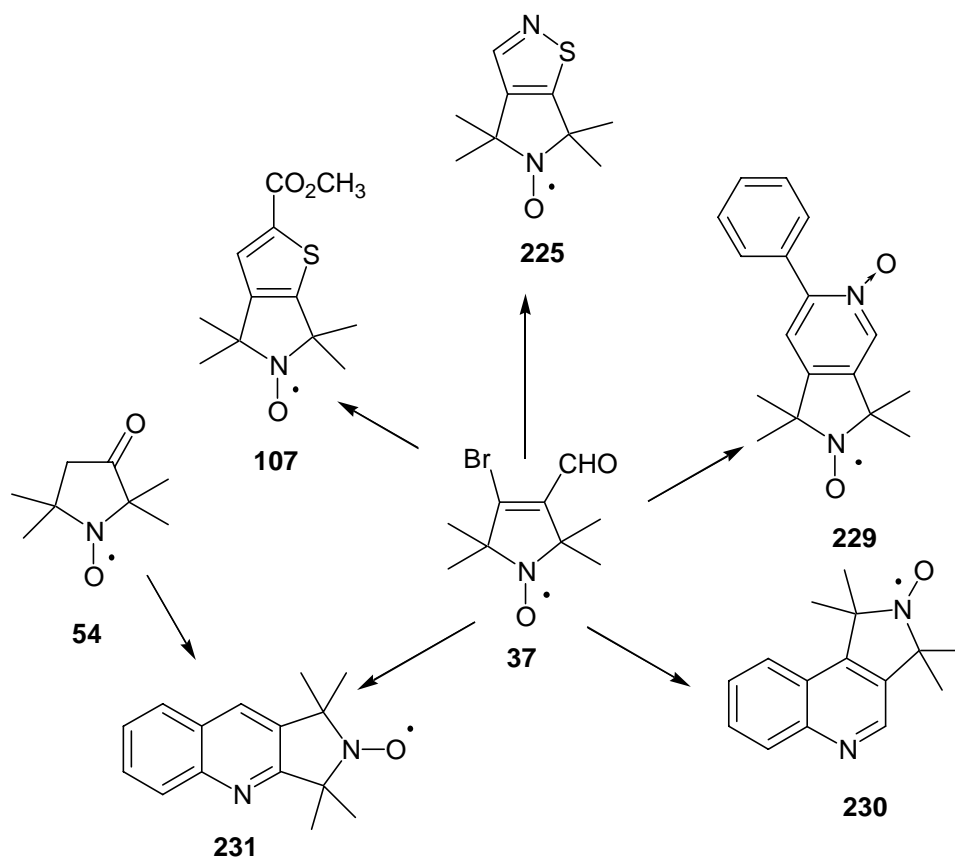
A **29** szimmetrikus paramágneses diénből Diels-Alder-reakcióval számos pirrolin nitroxidhoz anellált szénciklust (**190**, **191**, **192**), részlegesen telített (pl. **207**, **208**) és aromás (**210**) heterociklust állítottunk elő. A diénből nyerhető **142** dibromvegyületet a pirrolin

nitroxidhoz anellált **197** ciklopentadién, **216** pirrol, **220** furán és **221** piridazin előállításának a kiindulási anyaga volt (102. ábra).



102. ábra: A szimmetrikus paramágneses diénből szintetizált karbociklusok és heterociklusok

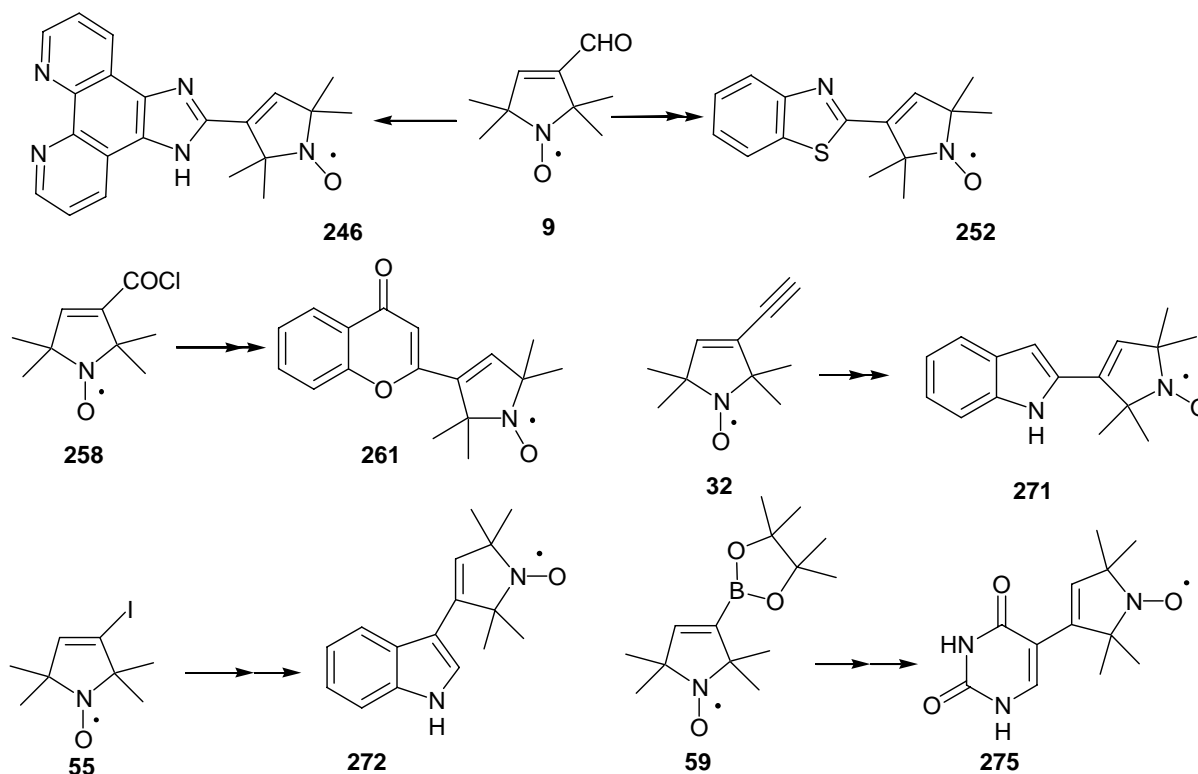
A **37**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehid is fontos kulcsvegyületnek bizonyult a pirrolin nitroxidhoz anellált heterociklusok szintézisében. Így a pirrolin nitroxidokhoz anellált tiofént (**107**), izotiazolt (**225**), piridin-*N*-oxidot (**229**) és kinolint (**230**, **231**) állítottunk elő. Utóbbi vegyület szerkezetigazoló szintézisét is megoldottuk **54** ketonból kiinduló Fiedlander-szintézissel (103. ábra). A pirrolin nitroxidhoz anellált karbo- és heterociklusoknak az oximetriai vizsgálatokban van jelentős szerepe, de az időközben megjelent legfrissebb ausztráliai kutatások szerint jelentős az antitumor és az oxidatív stresszt mérséklő hatásuk is.<sup>202</sup>



103. ábra: A **37**  $\beta$ -bróm- $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehidből kiinduló pirrolin nitroxiddal anellált heterociklusok szintézise.

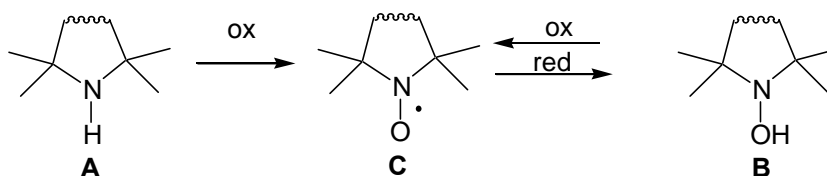
Klasszikus szintetikus módszerekkel **9** aldehidből és **258** savkloridból számos paramágnesesen módosított heterociklust állítottunk elő. Példaként a **246**, **252** paramágneses benzazoloikat és a **261** kromonvegyületet említtem. A Pd-katalizált reakciók segítségével **32** acetilénvegyületből a 2-szubsztituált indolt (**271**), **55** jódvegyületből a 3-szubsztituált indolt (**272**) és az **59** boronsavból a **275** spinjelölt uracilt tudtuk előállítani (104. ábra). A felsorolt

példák is jól mutatják, hogy az újonnan előállított paramágneses kulcsvegyületekből pirrolin nitroxiddal módosított vegyületek széles választéka állítható elő.



104. ábra: Pirrolin nitroxidhoz egy  $\sigma$ -kötésen keresztül kapcsolódó vegyületek.

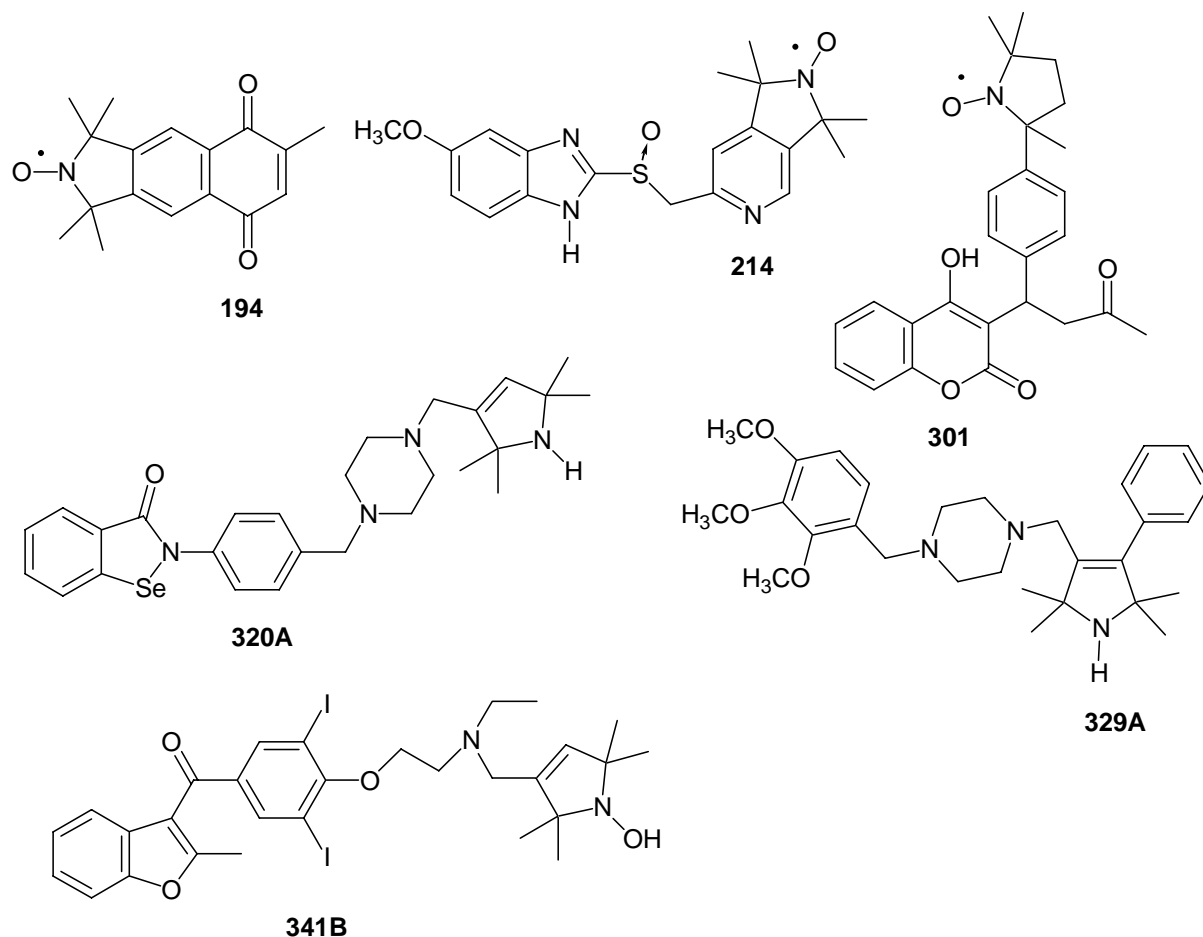
Kutatómunkánk több mint 2 évtizedes koncepciója, hogy a nitroxidok („C forma”) és redukált származékaik („A és B forma”) antioxidáns ill. farmakofor csoportként viselkednek. Ezek a formák szintetikus úton egymásba alakíthatók, de a metabolizis folyamán „A forma” „B” és „C formává” oxidálódik illetve a B és C forma között redox egyensúly alakul ki (105. ábra).



105. ábra: A paramágnesesen módosított gyógyszer-molekulák oxidált és redukált formái.

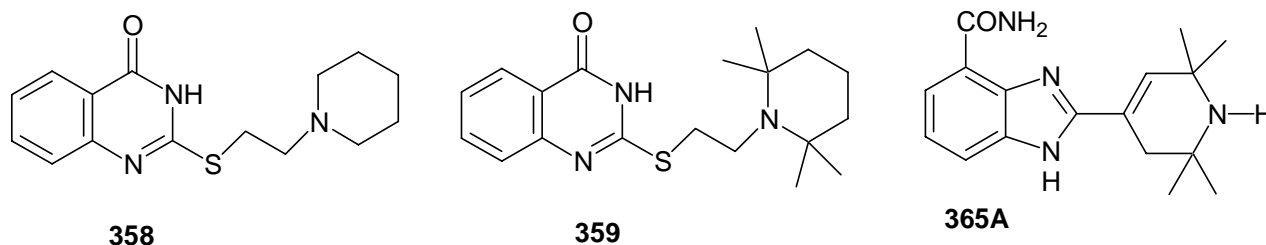
Mindezek alapján ígéretes célnak tűnt, hogy szén-szén kötés kialakításával és a funkciós csoportok megtartásával paramágnesesen módosított gyógyszereket szintetizáljunk. Így állítottunk elő számos, paramágneses gyűrűvel módosított bioaktív vegyületet, pl. **194**

gyökös K<sub>3</sub>-vitamint, a **214** omeprazolt és a **301** warfarint. Részletesebb *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat az ebselen, amiodaron és a trimetazidin módosított származékaival végeztünk. Ezek során azt találtuk, hogy **320A** gyökös analóg például az ebselenhez képest 2,5-szeres „glutathion-peroxidáz szerű” (GPx) katalitikus aktivitást mutatott, a **329A** trimetazidin-származék ROS, RNS okozta oxidatív stresszt védő/mérséklő hatású volt és a Langendorff-szív kísérletben is hatékonyabb volt, mint a trimetazidin alapvegyület. Az amiodaron analógok közül a **341B** vegyület hatásosabb és kisebb toxicitású volt mint az alapvegyület. Ezen példák és a korábbi szerkezetmódosítások alapján azt mondhatjuk, hogy a gyógyszermolekulák nitroxid heterociklusokkal ill. redukált prekursoraikkal végzett módosítása az eddig vizsgált esetekben nem vezetett az eredeti hatás elvesztéséhez, sőt növelte a molekula biológiai aktivitását, csökkentette a toxicitását ill. bővítette az alapvegyület hatásspektrumát is (106. ábra).



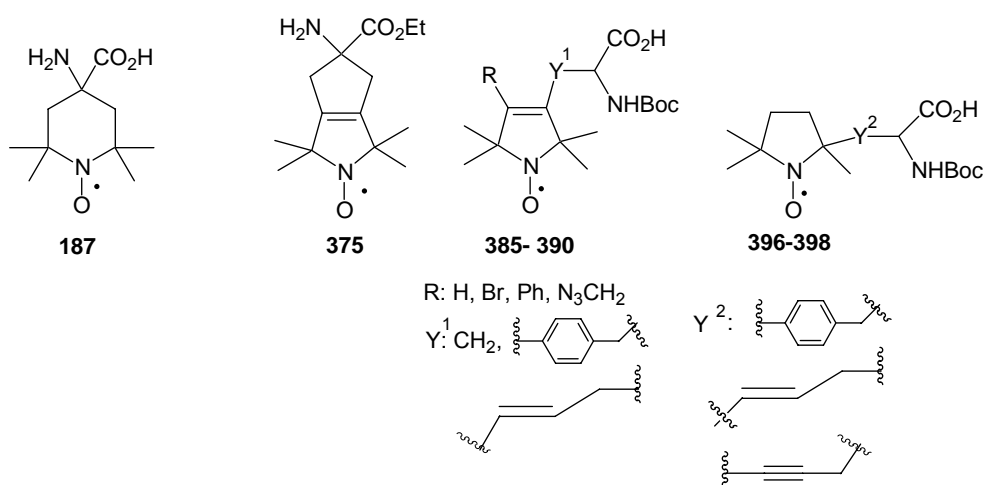
106. ábra: Új, nitroxidokkal és diamágneses prekursoraikkal módosított bioaktív vegyületek.

A szívre ható gyógyszereknél szerzett kedvező tapasztalatok alapján nitroxidokkal és redukált származékaikkal módosítottunk 4-karboxamido-benzimidazol és kinazolin-4-on alapú PARP-gátló vegyületeket. Ezek közül a **365A** és a „nem nitroxid alapú” **358** vegyület bizonyult a leghatékonyabb PARP-gátlónak (107. ábra).



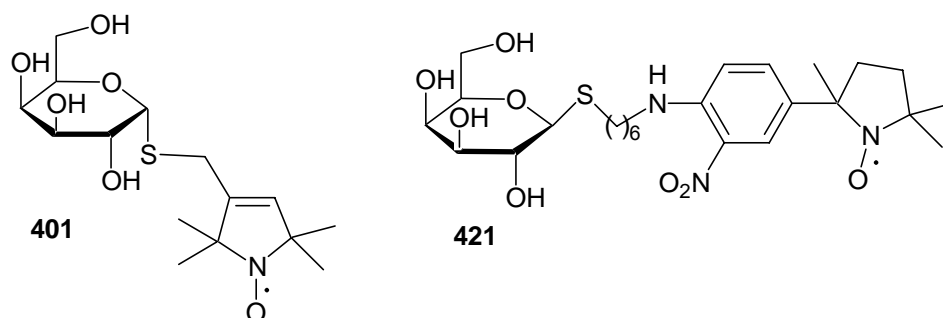
107. ábra: Az értekezésben szereplő, leghatékonyabbnak talált PARP-gátló vegyületek.

Biofizikai vizsgálatokhoz paramágneses aminosavakat (**375**, **385-390**, **396-398**) és spinjelölt tiogalaktopiranozidokat (**401**, **421**) szintetizáltunk. A **375** aminosav ötvözi a TOAC (**187**) aminosav előnyös sajátságait (merev oldallánc, kiralitáscentrum hiánya) és a pirrolin nitroxidok nagyobb stabilitását. A paramágneses aminosavak nagy változatosságát a 3,4-diszubsztituált pirrolin nitroxidok szintézisére kidolgozott módszereink tették lehetővé. Így különböző térkitöltésű és polaritású, paramágneses oldalláncot hordozó *N*-Boc védett  $\alpha$ -aminosavakat állíthattunk elő. A paramágneses aminosavak választékát a pirrolin nitroxid alapú aminosavaktól eltérő orientációjú 2-szubsztituált pirrolidin nitroxid alapú aminosavakkal (**396-398**) is bővíthettük. Az előállított aminosavak hátránya, hogy a fehérjébe történő beépítés esetén esetlegesen rezolválni kell őket. Ezek a munkák külföldi laboratóriumokkal együttműködve jelenleg is folyamatban vannak. A **385** aminosavat német kutatókkal együttműködve polipeptidbe is sikerült beépíteni (108. ábra).



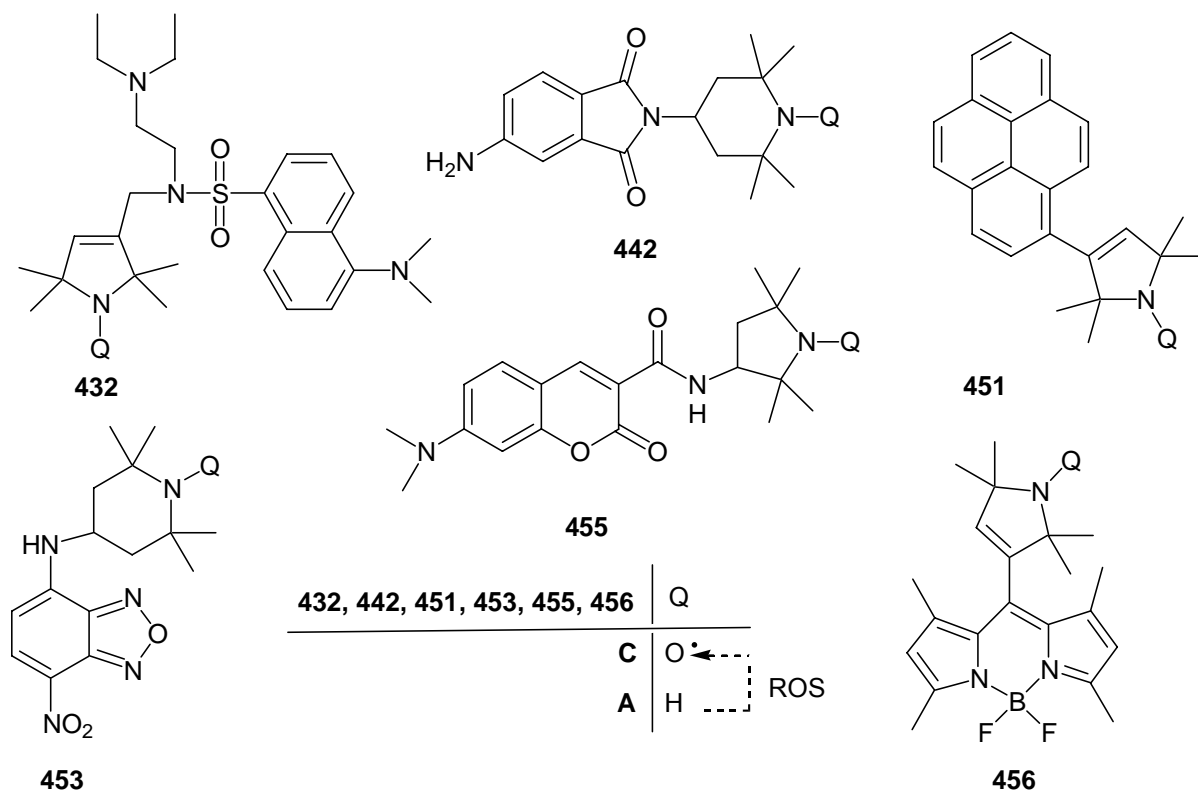
108. ábra: Új, paramágneses aminosavak

Amerikai kutatókkal közösen vizsgáltuk a tiogalaktóz-származékok laktóz-permeáz fehérjéhez történő kötődését ESR spektroszkópiával. Azt találtuk, hogy míg a rövidebb összekötőláncú **401** vegyület nem mutatott kötődést, addig a **421** hat szénatomos összekötőláncot és aromásgyűrűt tartalmazó vegyület már szelektív kötődést mutatott (109. ábra).



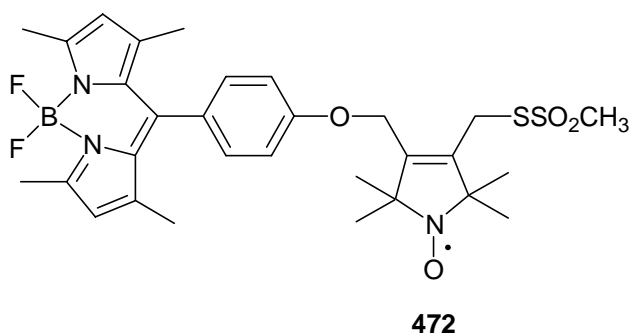
109. ábra: Két példa az értekezésben szereplő tiogalaktopiranozid-származékok közül a laktóz-permeáz fehérjéhez kötődő (**421**) és nem kötődő (**401**) vegyületekre.

A fluorofor vegyületekhez kapcsolt nitroxidok kioltják a fluoreszcenciát. Ha a nitroxid hidroxilaminná redukálódik vagy széngyökkel rekombinálódik diamágneses N-O-R csoporttá, a fluoreszcencia felerősödik. Ezek a folyamatok mind ESR spektroszkópiával, mind fluoreszcencia spektroszkópiával követhetővé válnak, ezért nevezik ezeket a vegyületeket kettős szenzor vegyületeknek. Intézetünkben számos, különböző hullámhosszon fluoreszkáló donor-akceptor molekulát állítottunk elő. Ennek az elvnek a továbbfejlesztése volt, hogy nem a nitroxidot, hanem annak prekursor szekunder aminszármazékát („A forma”) kapcsoljuk a fluoroforhoz (**432**, **442**, **451**, **453**, **455**, **456**) (110. ábra). A vegyületek közül az intenzíven fluoreszkáló **432A** vegyületet (DanePy) sikerrel alkalmaztuk az MTA-SzBK kutatóival a növényi stressz folyamatokban képződő szingulett oxigén kimutatására. A ROS-ok kimutatása azon alapszik, hogy a sztérikusan gátolt amin nitroxiddá („C forma”) oxidálódik és ez kioltja a hozzákapcsolt fluorofor fluoreszcenciáját és az ESR spektrumban megjelenik az izotróp triplett jel. Több példán keresztül bebizonyosodott, hogy a kettős szenzorvegyületek érzékenysége annál nagyobb, minél közelebb van egymáshoz a donor és az akceptor molekuláris rész. A vízdékonyságot növelő aminocsoportok beépítése kedvezően befolyásolhatja a ROS csapdázására használt vegyület biológiai alkalmazhatóságát, azonban az aminocsoportot tartalmazó oldalláncok és a sztérikusan gátolt aminok (A forma) alkalmazásakor figyelembe kell venni az esetlegesen fellépő fotoindukált elektrontranszfert vagy a töltésátmenettel járó folyamatokat is.



110. ábra: Néhány új, kettős szenzorvegyület

A kettős szenzorvegyületeket úgy fejlesztettük tovább, hogy a donor-akceptor vegyületet SH-specifikus reagáló csoporttal láttuk el. Így pl. a **472** vegyület alkalmas a fehérjék cisztein oldalláncának szimultán (fluoreszcens és spin) jelölésére (111. ábra).



111. ábra: SH-specifikus, kettősen (spin és fluoreszcens) jelölő vegyület.



## 7. Irodalomjegyzék

### 7. 1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Synthesis and Reactions of Symmetric Paramagnetic Pyrrolidine Diene.  
Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, 973-980.
- II. 3-Substituted-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yloxyl Radicals as a Versatile Synthon for Synthesis of New Paramagnetic Heterocycles.  
Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **1998**, 1476-1482.
- III. Palladium Catalysed Coupling Reactions of Paramagnetic Vinyl Halides.  
Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Synthesis* **2002**, 2365-2372.
- IV. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Paramagnetic Vinyl Bromides and Paramagnetic Boronic Acids.  
Kálai, T.; Jekő, J.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 439-446.
- V. Synthesis of New, Paramagnetically Modified Heterocycles.  
Kálai, T.; Bognár, B.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 2573-2579.
- VI. Synthesis of a Paramagnetic Boronic Acid as a Useful Synthetic Building Block and Carbohydrate Affinity Spin Probe.  
Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 8395-8398.
- VII. Synthesis of New Pyrrolidine Nitroxide Epoxides as Versatile Paramagnetic Building Blocks.  
Kálai, T.; Sár, P. C.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8125-8127.
- VIII. Synthesis of 2-Substituted Pyrrolidine Nitroxide Radicals.  
Gadányi, Sz.; Kálai, T.; Jekő, J.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2000**, 2039-2046.
- IX. Synthesis and Reactions of Paramagnetic Aromatic Aldehydes as Useful Synthetic Building Blocks.  
Kálai, T.; Kulcsár, Gy.; Jekő, J.; Ösz, E.; Hideg, K. *Synthesis* **2004**, 2115-2120.
- X. 1-Oxyl-Pyrrolidine Radicals as New Homobifunctional Cross-linking Spin Label.  
Kálai, T.; Jekő, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Synthesis* **2003**, 2084-2088.
- XI. Motion of Spin Labeled Side Chains in T4 Lysozyme: Effect of Side Chain Structure.  
Mchaourab, H.S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. *Biochemistry* **1999**, 38, 2947-2955.
- XII. Molecular Motion of Spin Labeled Side Chains in  $\alpha$ -Helices: Analysis by Variation of Side Chain Structure.  
Columbus, L.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K.; Hubbell, W. L. *Biochemistry* **2001**, 40, 3828-3846.

- XIII. Synthesis of Paramagnetic Carbo- and Heterocycles.  
Kulcsár, Gy.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2003**, 1361-1366.
- XIV. Synthesis of Pyrroline Nitroxide Annulated Carbocycles and Heterocycles.  
Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2000**, 831-837.
- XV. Synthesis of Spin Labelled Chromones.  
Müller, É.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2000**, 1415-1420.
- XVI. Synthesis of Paramagnetic and Diamagnetic Flavones and Flavonones.  
Kálai, T.; Kulcsár, Gy.; Ösz, E.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Arkivoc* **2004**, 266-276.
- XVII. Combining Benzol[*d*]isosenazol-3-ones with Sterically Hindered Alicyclic Amines and Nitroxides: Enhanced Activity as Glutathione Peroxidase Mimics.  
Kálai, T.; Mugesh, G.; Roy, G.; Sies, H.; Berente, Z.; Hideg, K. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3564-3569.
- XVIII. Structure-activity Studies on the Protection of Trimetazidine Derivatives Modified with Nitroxides and their Precursor from Myocardial Ischemia-reperfusion Injury.  
Kálai, T.; Khan, M.; Balog, M.; Kutala, K. V.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 5510-5516.
- XIX. Synthesis and Evaluation of the Permeability Transition Inhibitory Characteristics of Paramagnetic and Diamagnetic Amiodarone Derivatives.  
Kálai, T.; Várbiro, G.; Bognár, Z.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Ösz, E.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2629-2636.
- XX. Synthesis and Study of New 4-Quinazolinone Inhibitors of the DNA Repair Enzyme Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP).  
Kulcsár, Gy.; Kálai, T.; Ösz, E.; Sár, C. P.; Jekő, J.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Arkivoc* **2003**, (part iv), 121-131.
- XXI. New Alicyclic-Amine-Substituted 4-Carboxamido-Benzimidazoles as PARP-Inhibitors and Antioxidants.  
Hideg, K.; Kálai, T.; Sümegi, B. WO 2004/096793 A1 (szabadalom)
- XXII. Synthesis of New Conformationally Rigid Paramagnetic  $\alpha$ -Amino Acids.  
Balog, M.; Kálai, T.; Jekő, J.; Berente, Z.; Steinhoff, H.-J.; Engelhard, M.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 9213-9217.
- XXIII. Synthesis of New 2,2,5,5-Tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-ylloxyl Radicals and 2-Substituted-2,5,5-trimethylpyrrolidin-1-ylloxyl Radicals Based  $\alpha$ -Amino Acids.  
Balog, M.; Kálai, T.; Jekő, J.; Steinhoff, H.J.; Engelhard, M.; Hideg, K. *Synlett* **2004**, 2591-2593.
- XXIV. Binding of Spin-Labeled Galactosides to the Lactose Permease of *Escherichia coli*.  
Zhao, M.; Kálai, T.; Hideg, K.; Altenbach, C.; Hubbell, W. L.; Kaback, R. H. *Biochemistry* **2000**, 39, 11381-11388.

- XXV. Double (Fluorescent and Spin) Sensors for Detection of Reactive Oxygen Species in the Thylakoid Membrane.  
Kálai, T.; Hideg, E.; Vass, I.; Hideg, K. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, 24, 649-652.
- XXVI. Synthesis and Structure Optimisation of Double (fluorescent and spin) Sensor Molecules.  
Kálai, T.; Hankovszky, H. O.; Hideg, É.; Jekő, J.; Hideg, K. *Arkivoc* **2002**, (part iii), 112-120.
- XXVII. Synthesis and Study of Double (EPR Active and Fluorescent) Chemosensors in the Presence of  $\text{Fe}^{3+}$  Ion.  
Hankovszky, H. O.; Kálai, T.; Hideg, É.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synth. Commun.* **2001**, 31, 975-986.
- XXVIII. Synthesis of New Double (Spin and Fluorescence) Sensor Reagents and Labels.  
Bognár, B.; Ósz, E.; Hideg, K.; Kálai, T. *J. Heterocyclic Chem.* **2006**, 43, 81-86.
- XXIX. Synthesis of Paramagnetic BODIPY Dyes as new Double (spin and fluorescence) Sensors.  
Kálai, T.; Hideg, É.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8497-8499.
- XXX. Synthesis of New, BODIPY-based Sensors and Labels  
Kálai, T.; Hideg, K. *Tetrahedron* **2006**, 62, 10352-10360.

## 7. 2. Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

1. Lebedev, O. A.; Kazarnovskii, S. N. *Trudy po khimii i khimologii* (Gorkii), **1959**, 8, 649.
2. Hoffman, A.; Henderson, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 4671.
3. Hubbell, W. L.; McConnell, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 314.
4. Rozantsev, E. G. *Free Nitroxyl Radicals* Plenum Press: New York, 1970.
5. Rassat, A.; Rey, P. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 815.
6. McConnell, H. M.; Hamilton, C. L. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, 60, 776.
7. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Tigyi, J. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1978**, 98, 339.
8. Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Lex, L.; Kulcsár, Gy. *Synthesis* **1980**, 911.
9. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lex, L. *Synthesis* **1980**, 914.
10. Morris, S.; Sosnovsky, G.; Hui, B.; Huber, C. O.; Rao, N. U. M.; Swartz, H. M. *J. Pharm. Sci.* **1991**, 80, 149.
11. Berliner, L. J.; Grünwald, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K. *Anal. Biochem.* **1982**, 119, 450.
12. Wong, L. T. L.; Schwenk, R.; Hsia, J. C. *Can. J. Chem.* **1974**, 52, 3381.
13. Csekő, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 940.
14. Khorana, H. G. *Science* **1979**, 203, 614.
15. Froncisz, W.; Hyde, J. S. *J. Magn. Reson.* **1982**, 47, 515.
16. Hubbell, W. L.; Altenbach, C.; Hubbell, C. M.; Khorana, H. G. *Adv. Protein Chem.* **2003**, 63, 243.
17. Chudinov, A. V.; Rozantsev, E. G.; Rosinov, B. V. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Khim.* **1983**, 409.
18. Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Halász, H. A.; Sohár, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1988**, 2905.
19. Hideg, K.; Sár, P. C.; Hankovszky, H. O.; Tamás, T.; Jerkovich, Gy. *Synthesis* **1993**, 390.
20. Kálai, T.; Rozsnyai, B.; Jerkovich, Gy.; Hideg, K. *Synthesis* **1994**, 1079.
21. Lösel, R. M.; Philipp, R.; Kálai, T.; Hideg, K.; Trommer, W. E. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, 578.
22. Hideg, K.; Csekő, J.; Hankovszky, H. O.; Sohár, P. *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 1482.
23. Suzuki, A.; Brown, H. C. *Organic Synthesis via Boranes*, Vol. 3.; Aldrich Chemical Company, Inc.: Milwaukee, 2003.

24. Mátyus, P.; Maes, B. U. W.; Riedl, Z.; Hajós, G.; Lemiére, G. L. F.; Tapolcsányi, P.; Monsieurs, K.; Éliás, O.; Dommisse, R. A.; Krajsovsky, G. *Synlett* **2004**, 1123.
25. Suzuki, A. *Chem. Commun.* **2005**, 4759.
26. Jahr, D.; Rebhan, K.; Schwarzhans, K. E.; Wiedemann, J. Z. *Naturforsch.* **1973**, 28b, 55.
27. Beck, W.; Schmidtner, K. *Chem. Ber.* **1967**, 100, 3363.
28. Barton, H. R.; Bashiardes, G.; Fourrey, J-L. *Tetrahedron* **1988**, 44, 147.
29. DiCesare, N.; Lakowicz, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 9105.
30. Valeur, B. *Molecular Fluorescence* Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
31. Hall, D. G. *Boronic Acids* Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
32. Kawasaki, I.; Yamashita, M.; Ohta, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 1831.
33. Chaumel, H.; Le Drian, C.; Defoin, A. *Synthesis* **2002**, 757.
34. Takahashi, K.; Takagi, J.; Ishiyama, T.; Miyaura, N. *Chem. Lett.* **2000**, 126.
35. Ishiyama, T.; Matsuda, N.; Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11018.
36. Kohler, E. P.; Richtmyer, N. K.; Hester, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, 53, 205.
37. Delpierre, G. R.; Lamchen, M. *J. Chem. Soc.* **1963**, 4693.
38. Hideg, K.; Lex, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1987**, 1117.
39. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lovas, M. J.; Jerkovich, Gy.; Rockenbauer, A.; Győr, M.; Sohár, P. *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 1392.
40. Bonnett, R.; Brown, R. F. C.; Clark, V. M.; Sutherland, I. O.; Todd, A. *J. Chem. Soc.* **1959**, 2094.
41. Keana, J. F. W. *Spin Labeling II, Theory and Application* (Berliner, L. J. Ed.), Academic Press: New York, 1979, pp 115-172.
42. Rockenbauer, A.; Korecz, L.; Hideg, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1993**, 2149.
43. Benfaremo, N.; Steenbock, M.; Klapper, M.; Mullen, K.; Enkelmann, V.; Cabrera, K. *Liebigs Ann.* **1996**, 1413.
44. Larock, R. C.; Lu, Y. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2846.
45. Bálint, J.; Kiss, V.; Egri, G.; Kálai, T.; Demeter, Á.; Balog, M.; Fogassy, E.; Hideg, K. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 671.
46. Mullins, R. J.; Williams, D. R. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry* Wiley: Hoboken, 2005, pp184-192.
47. Chatani, S. Nakamura, M.; Akahane, H.; Kohyama, N.; Taki, M.; Arata, T.; Yamamoto, Y. *Chem. Commun.* **2005**, 1880.

48. Gaffney, J. B.; Willingham, G. L.; Schepp, R. S. *Biochemistry* **1983**, 22, 881.
49. Hideg, K.; Sár, P. C.; Hankovszky, H. O.; Jerkovich, Gy. *Synthesis* **1991**, 616.
50. Dormán, Gy. *A kémia újabb eredményei* 89. köt, Akadémiai Kiadó: Budapest, 2001, pp11-171.
51. Shen, J.; Bottle, S.; Khan, N.; Grinberg, O.; Reid, D.; Micallef, A.; Swartz, H. *Appl. Magn. Reson.* **2002**, 22, 357.
52. Griffiths, P. G.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Solomon, D. H. *Aust. J. Chem.* **1983**, 36, 397.
53. Keddie, D. J.; Johnson, T. E.; Arnold, D. P.; Bottle, S. E. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2593.
54. Miller, T. R.; Hopkins, P. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 981.
55. Tamura, R.; Susuki, S.; Azuma, N.; Matsumoto, A.; Toda, F.; Kamimiura, A.; Hori, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 878.
56. Tamura, R.; Susuki, S.; Azuma, N.; Matsumoto, A.; Toda, F.; Ishii, Y. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6820.
57. Li, Y.; Mao, Z.; Xu, J.; Yang, Y.; Guo, Z.; Zhu, D.; Li, J.; Yin, B. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 265, 361.
58. Shapiro, A. B.; Pavlikov, V. V.; Rozantsev, E. G. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **1977**, 232, 398.
59. Rozantsev, E. G.; Shapiro, A. B.; Komzolova, N. N. *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim.* **1965**, 1100.
60. Ozhogina, A. O. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 553.
61. Myshkina, L. A.; Stoyanovich, F. M.; Goldfarb, Y. A.; Kazorina, E. K. *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim.* **1984**, 2083.
62. Zhang, Y-K.; Shen, D-K. *Z. Naturforsch.* **1993**, 48b, 505.
63. Keana, J. F. W.; Coumo, J.; Lex, L.; Seyedrezai, S. E. *J. Org. Chem.* **1983**, 18, 2671.
64. Sosnovsky, G.; Lukszo, J.; Gutierrez, P. L.; Scheffler, K. *Z. Naturforsch.* **1987**, 42b, 376-380.
65. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lex, L.; Kulcsár, Gy.; Halász, H. A. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 1432.
66. Corvaja, C.; Maggini, M.; Prato, M.; Scorrano, G.; Venzin, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8857.
67. Taylor, R. *Lecture Notes on Fullerene Chemistry* Imperial College Press: London, 1999.
68. Nantz, H. M.; Radisson, X.; Fuchs, P. L. *Synth. Commun.* **1987**, 17, 55.

69. Wegner, H. A. ; Scott, T. A.; de Meijere, A. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 883.
70. Pschorr, R. *Chem. Ber.* **1896**, 29, 496.
71. Micallef, A. S.; Blinco, J. P.; George, G. A.; Reid, D. A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Bottle, S. A. *Polym. Degr. Stability* **2005**, 89, 427.
72. Bogert, D. E. L; Weinreb, S. M. *Hetero Diels-Alder Methodology in Organic Synthesis* Academic Press: San Diego, 1987.
73. Wichterle, O.; Rocek, J. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* **1954**, 19, 282.
74. Kromer, W. *Digestion* **1995**, 56, 443.
75. Sekhar, B. C.; Ramadas, S. R.; Ramana, D. V. *Heterocycles* **2000**, 53, 941.
76. Marson, C. M.; Giules, P. R. *Synthesis Using Vilsmeier Reagents* CRC Press: Boca Raton, 1994.
77. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lex, L.; Földesi, A.; Sohár, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1980**, 699.
78. Kálai, T.; Sáska, P.; Szabó, Z.; Jekő, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K. *Synth. Commun.* **1997**, 27, 2041.
79. Kálai, T.; Jekő, J.; Ósz, E.; Hideg, K. *Synth. Commun.* **2003**, 33, 1433.
80. Schulze, B.; Kristen, G.; Kirrbach, S.; Rahm, A.; Heimgartner, H. *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 1059.
81. Sampathkumar, N. M.; Kumar, N. V.; Rajendram, S. P. *Synth. Commun.* **2004**, 34, 2019.
82. Pflum, D. A. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry* (Li, J. J. Ed.) Wiley: Hoboken, 2005, pp 411-415.
83. Hurd, C. D.; Mori, R. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 5359.
84. Ma, D.; Cai, Q.; Xie, X. *Synlett* **2005**, 1767.
85. Pflum, D. A. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry* (Li, J. J. Ed.) Wiley: Hoboken, 2005, pp 407-410.
86. van Leusen, A. M.; Hoogenboom, B. E.; Siderius, H. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 13, 2369.
87. Lindsey, J. S.; Prathapan, S.; Johnson, T. E.; Wagner, R. W. *Tetrahedron* **1994**, 50, 8941.
88. Varma, R. S.; Saini, K. R.; Prakash, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2621.
89. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Jerkovich, Gy. *Synthesis* **1989**, 526.
90. Baker, W. *J. Chem. Soc.* **1933**, 1381.
91. Bois, A.; Beney, C.; Mariotte, A-M.; Boumenjel, A. *Synlett* **1999**, 1480.

92. Xing, R.; Liu, S.; Gou, Z.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C.; Li, Z.; Li, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1537.
93. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.
94. Cacchi, S.; Fabrizi, G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2873.
95. Li, J. J.; Gribble, G. W. *Palladium in Heterocyclic Chemistry*, Pergamon: Oxford, 2000.
96. Wellmar, U.; Hörnfeldt, A-B.; Gronowitz, S. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 1159.
97. Gronowitz, S.; Hörnfeldt, A-B.; Musil, T. *Chem. Script.* **1986**, *26*, 305.
98. Hideg, K.; Lex, L.; Hankovszky, H. O.; Tigyi, J. *Synth. Commun.* **1979**, *9*, 781.
99. Miyazaki, J.; Hideg, K.; Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1103*, 62.
100. Kirchner, J. J.; Hustedt, E. J.; Robinson, B. H.; Hopkins, B. P. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 593.
101. Struve, W. G.; McConnell, H. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *49*, 1631.
102. Gnewuch, T.; Sosnovsky, G. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 203.
103. Leute, R.; Ullmann, E. F. Goldstein, A.; Gerzenberg, L. A. *J. Am. Med. Assoc.* **1972**, *221*, 1231.
104. Montgomery, N. R.; Holtzman, J. L.; Leute, R. K.; Dewes, J. S.; Bolz, G. *Clin. Chem.* **1975**, *21*, 221.
105. Zhdanov R. I.; Komarov, A. M.; Kayushin, L. P. in *Bioactive Spin Labels*, Springer Verlag: Berlin, 1992, pp 585-610.
106. Zhdanov, R. I. in *Bioactive Spin Labels*, (Zhdanov, R. I. Ed.) Springer Verlag: Berlin, 1992, pp 429-438.
107. Zhdanov, R. I.; Kadenbatsi, I. B.; Kholodov, L. E. in *Bioactive Spin Labels*, (Zhdanov, R. I. Ed.) Springer Verlag: Berlin, 1992, pp 527-548.
108. Swartz, H. M; Timmins, G. S. *Toxicology of the Human Environment* (Rhodes, J. C. Ed.) Taylor and Francis: London, 2000, pp 91-111.
109. Twomey, P.; Taira, J.; DeGraff, W; Mitchell, J. B.; Russo, A.; Krishna, M. C.; Hankovszky, H. O.; Frank, L.; Hideg, K. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*, 909.
110. Couet, W. R.; Brasch, R. C. ; Sosnovsky, G.; Tozer, T. N. *Magn. Reson. Imag.* **1985**, *3*, 83.
111. Chen, K.; Swartz, H. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *970*, 720.
112. Li, B.B.; Gutierrez, P.L.; Blough, N. V. *Meth. Enzymol.* **1999**, *300*, 202.
113. Merbouh, N.; Bobbitt, J. M.; Brückner, C. *Org. Prep. Proced. Int.* **2004**, *36*, 1.



114. Krishna, M. C.; Russo, A.; Mitchell, J. B.; Goldstein, S.; Dafni, H.; Samuni, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26026.
115. Mitchell, J. B.; Krishna, M. C.; Samuni, A.; Kuppusamy, P.; Hahn, S. M.; Russo, A. *Toxicology of the Human Environment* (Rhodes, J. C. Ed.) Taylor and Francis: London, 2000, pp 113-138.
116. Goldstein, S.; Samuni, A.; Hideg, K.; Merényi, G. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 3679.
117. Krishna, M. C.; Degraff, W.; Hankovszky, H. O.; Sár, P. C.; Kálai, T.; Jekő, J.; Russo, A.; Mitchell, J. B.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3477.
118. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Bódi, I.; Frank, L. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1138.
119. Shankar, R.A.; Hideg, K.; Zweier, J.L.; Kuppusamy, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 838.
120. Deres, P.; Halmosi, R.; Tóth, A.; Kovács, K.; Pálfi, A.; Habon, T.; Czopf, L.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Tóth, K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *45*, 36.
121. Sár, P. C.; Kálai, T.; Bárócz, M. N.; Jerkovich, Gy.; Hideg, K. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 2929.
122. Li, H.; Xu, K. Y.; Zhou, L.; Kálai, T.; Zweier, J. L.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 563.
123. Emanuel, M. N.; Konovalova, N. P.; Dyatchkovskaya, R. F. *Cancer Treatment Repts.* **1976**, *60*, 1605.
124. Emanuel, M. N.; Konovalova, N. P.; Dyatchkovskaya, R.; Denisova, L. K. *Antibiotiki*, **1982**, 811.
125. Tian, X.; Wang, Y.; Yang, M.; Chen, Y. *Life Sci.* **1997**, *60*, 511.
126. Sabitha, G.; Reddy, K. K. S. G.; Reddy, S. Ch.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4129.
127. Hankovszky, H. O.; Sár, P. C.; Hideg, K.; Jerkovich, Gy. *Synthesis* **1991**, 91.
128. Cantineau, R.; Thiange, G.; Pelenevaux, A.; Christiaens, L.; Guillaume, M. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1986**, *23*, 59.
129. Lesser, R.; Weiss, R. *Chem. Ber.* **1924**, *57*, 1077.
130. Mugesh, G.; duMont, W. W.; Sies, H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2125.
131. Roveri, A.; Maiorino, M.; Ursini, F. *Meth. Enzymol.* **1994**, *233*, 202.
132. Kantor, P. F.; Lucien, A.; Kozak, R.; Lopaschuk, G. D. *Circ. Res.* **2000**, *86*, 850.
133. Maupoil, V.; Rochette, L.; Tabard, A.; Clauser, P.; Harpey, C. *Adv. Experiment. Med. Biol.* **1990**, *264*, 373.

134. Ohtaka, H.; Kanazawa, T.; Ito, K.; Tsukamoto, G.; *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3270.
135. Singh, S. N.; Fletcher, R. D.; Fisher, S. G.; Singh, B. N.; Lewis, H. D.; Deedwania, P.C.; Massie, B. M.; Colling, C.; Lazzeri, D. *N. Eng. J. Med.* **1995**, *333*, 77.
136. Wilson, B. D.; Lippmann, M. L. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1990**, *141*, 1553.
137. Vrobel, T. R.; Miller, P. E.; Mostow, N. D.; Rakita, L. *Progr. Cardiovasc. Dis.* **1989**, *31*, 393.
138. Myers, J. L.; Kennedy, J. L.; Plump, V. J. *Hum. Pathol.* **1987**, *18*, 349.
139. Carlsson, B.; Singh, B. N.; Temciuc, M.; Nilsson, S.; Li, Y-L.; Mellin, C.; Malm, J. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 623.
140. Robertson, J.; Biel, J. H.; DiPerro, F. *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 381.
141. Várbíró, G.; Veres, B.; Gallyas, F.; Sümegi, B. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *31*, 548.
142. Bognár, Z.; Kálai, T.; Pálfi, A.; Hantó, K.; Bognár, B.; Márk, L.; Szabó, Z.; Tapodi, A.; Radnai, B.; Sárszegi, Z.; Szántó, Á.; Gallyas, F.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Várbíró, G. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 835.
143. Pellicciari, R.; Camaioni, E.; Costantino, G. *Progress Med. Chem.* **2004**, *42*, 125.
144. Cassarino, D.S.; Parks, J. K.; Parker, V. D.; Benett, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1453*, 49.
145. Baudoin, B.; Ribeill, B.; Vicker, N. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2833.
146. Cheung, A.; Zhang, J. *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 24.
147. Pálfi, A.; Tóth, A.; Kulcsár, G.; Hantó, K.; Deres, P.; Bartha, É.; Halmosi, R.; Szabados, E.; Czopf, L.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Tóth, K. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 273.
148. White, A. W.; Almassy, R.; Calvert, H. A.; Curtin, N. J.; Griffin, R. J.; Hotomsky, Z.; Maegley, K.; Newell, D. R.; Srinivasan, S.; Golding, B. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4084.
149. Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Wink, D. A.; Grisham, M. B. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 40.
150. Alexy, T.; Tóth, A.; Marton, Z.; Horváth, B.; Koltai, K.; Fehér, G.; Kesmarky, G.; Kálai, T.; Hideg, K.; Sümegi, B.; Tóth, K. *J. Cardiovasc. Pharm.* **2004**, *43*, 423.
151. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
152. Barbosa, S. R.; Cilli, E. M.; Lamy-Freund, M. T; Castrucci, L. A. M.; Nakaie, C. R. *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 45.
153. Dougherty, D. A. *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645.

154. Shafer, A. M.; Kálai, T.; Liu, S.Q.B.; Hideg, K.; Voss, J. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8470.
155. O'Donnell, M. J.; Boniece, J. M.; Earp, S. E. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *30*, 2641.
156. Lex, L.; Hideg, K.; Hankovszky, H. O. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1448.
157. Kotha, S.; Kuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1565.
158. Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790.
159. Bárócz, M. N.; Hankovszky, H. O.; Sár, P. C.; Jerkovich, Gy.; Hideg, K. *Synthesis* **1996**, 204.
160. Becker, C. F. W.; Lausecker, K.; Balog, M.; Kálai, T.; Hideg, K.; Steinhoff, H.-J.; Engelhard, M. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, S34-S39.
161. Kaback, H. R. *Ann. Rev. Biophysics Biophys. Chem.* **1986**, *15*, 279.
162. Schuldiner, S.; Kaback, H. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *472*, 399.
163. Bonner, W. A.; Kahn, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2241.
164. Slama, J.; Rando, R. R. *Carbohydr. Res.* **1981**, *88*, 213.
165. Zemplén, G. *Chem. Ber.* **1926**, *59*, 2402.
166. Guan, L.; Sahin-Tóth, M.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kaback, H. R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10641.
167. Stryer, L.; Griffith, H. O. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1785.
168. Green, J. A.; Singer, L. A.; Parks, J. H. *J. Chem. Phys.* **1973**, *58*, 2690.
169. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum Press: New York, 1999.
170. Lozinsky, E.; Shames, A. I.; Likhtenshtein, G. I. *Recent Res. Devel. Photochem. Photobiol.* **2001**, *5*, 41.
171. Green, S. A.; Simpson, D. J.; Zhou, G.; Ho, P. S.; Blough, N. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7337.
172. Herbelin, S. E.; Blough, N. V. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8470.
173. Vogel, V. R.; Rubtsova, E. T.; Likhtenshtein, G. I.; Hideg, K. *J. Photochem. Photobiol. A* **1994**, *83*, 229.
174. Gerlock, J. L.; Zacmanidis, P. J.; Bauer, D. R.; Simpson, D. J.; Blough, N. V.; Salmeen, I. T. *Free Rad. Res. Commun.* **1990**, *10*, 119.
175. Li, B.; Gutierrez, P. L.; Blough, N. V. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4295.
176. Blough, N. V.; Simpson, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1915.
177. Aliaga, C.; Aspée, A.; Scaiano, J. C. *Organic Lett.* **2003**, *5*, 4145.

178. Medvedeva, N.; Martin, V. V.; Weis, A. L.; Likhtenshtein, G. I.; *J. Photochem. Photobiol A* **2004**, *163*, 45.
179. Wang, H.; Zhang, D.; Guo, X.V.; Zhu, L.; Shuai, Z.; Zhu, D. *Chem. Commun.* **2004**, 670.
180. Hideg, É.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11405.
181. Hideg, É.; Ogawa, K.; Kálai, T.; Hideg, K. *Physiol. Plant.* **2001**, *112*, 10.
182. Hideg, É.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* Vol. III (Garab, G. Ed.), Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, 1998, pp 2139-2142.
183. Hideg, É.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **2000**, 355, 1511.
184. Hideg, É.; Vass, I.; Kálai, T.; Hideg, K. *Meth. Enzymol.* **2000**, *319*, 77.
185. Hideg, É.; Barta, C.; Kálai, T.; Vass, I.; Hideg, K.; Asada, K. *Plant Cell. Physiol.* **2002**, *43*, 1154.
186. Barta, C.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I.; Hideg, É. *Funct. Plant. Biol.* **2004**, *31*, 23.
187. Ramachandram, B.; Samanta, A. *Chem. Commun.* **1997**, 1037.
188. Valeur, B. *Molecular Fluorescence* Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
189. de Silva, A. P.; Fox, D. B.; Moody, T. S. *Stimulating Concepts in Chemistry* (Vögtle, F.; Stoddart, J. F.; Shibasaki, M. Eds.) Wiley-VCH: Weinheim, 2000, pp 307-315.
190. Matsushita, Y.; Takahashi, M.; Moriguchi, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 333.
191. Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1755.
192. Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* 10th ed., Eugene, 2005.
193. Thoresen, L. H.; Kim, H.; Welch, M. B.; Burghart, A.; Burgess, K. *Synlett* **1998**, 1276.
194. Kollmannsberger, M.; Rurack, K.; Resch-Genger, U.; Daub, J. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10211.
195. Turfan, B.; Akkaya, E. U. *Organic Lett.* **2002**, *4*, 2857.
196. Ullman, E. F.; Osiecki, J. H.; Boocock, D. G.; Darcy, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7049.
197. Kalyanaraman, J. J. B.; Hyde, J. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 926.
198. Kálai, T.; Jekő, J.; Szabó, Z.; Párkányi, L.; Hideg, K. *Synthesis* **1997**, 1049.

199. Himel, C. M.; Aboul-Saad, W. G.; Uk, S. *J. Agric. Food. Chem.* **1971**, *19*, 1175.
200. Coskun, A.; Deniz, E.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5187.
201. Hideg, K.; Kálai, T.; Sár, P. C. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 437.
202. Gueven, N.; Luff, J.; Peng, C.; Hosokawa, K.; Bottle, S.; Lavin, M. F. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 992.

## Fontosabb rövidítések jegyzéke

AA	: aszkorbinsav
Ac	: acilcsoport
ACN	: acetonitril
ADP	: adenzin-difoszfát
ATP	: adenzin-trifoszfát
Boc	: <i>t</i> -butoxikarbonilcsoport
BODIPY	: 4,4-difluoro-4-bór-3 <i>a</i> ,4 <i>a</i> -diazas-indacén
CON	: kontroll
CsA	: Cyclosporin-A
DanePy	: 3-[ <i>N</i> -( $\beta$ -dietil-aminoetil)- <i>N</i> -danzil]aminometil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrol
dba	: dibenzilidén-aceton
DBU	: 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-7-én
DCC	: diciklohexil-karbodiimid
DDQ	: 2,3-diklór-5,6-diciano-1,4-benzokinon
DMF	: <i>N,N</i> -dimetilformamid
DNS	: dezoxi-ribonukleinsav
DMSO	: dimetil-szulfoxid
ED	: hatásos dózis
ESR	: elektronspin rezonancia spektroszkópia
Et	: etilcsoport
GPx	: glutation-peroxidáz
IC	: inhibitor koncentráció
NAD <sup>+</sup>	: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
NADH	: redukált NAD <sup>+</sup>
NMR	: mágneses magrezonancia spektroszkópia
Me	: metilcsoport
MPT	: membrán áteresztőképesség
PARP	: poli(ADP-ribóz)-polimeráz
PET	: fotoindukált elektron transzfer
Ph	: fenilcsoport
RNS	: reaktív nitrogénszármazék

ROS: reaktív oxigénszármazék

SOD: szuperoxid-dizmutáz

TEMPO: 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidin

TFA: trifluorecetsav

TOAC: 4-amino-4-karboxi-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidin

TOSMIC: tozil-metil-izocianid

## KÖSZÖNETMONDÁS

Köszönetet mondok Dr. Hideg Kálmán egyetemi tanárnak, volt tanszékvezetőmnek, mentoromnak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett kutatócsoport munkájába bekapcsolódhattam, értékes tanácsaiért, erkölcsi és szakmai támogatásáért, biztatásáért. Köszönöm Dr. P. Sár Ceciliának, jelenlegi tanszékvezetőmnek támogatását, segítségét és az értekezés kéziratának átnézését. Köszönöm Dr. Neil V. Blough professzornak (University of Maryland, College Park, USA), hogy csoportjában 1 évet tölthettem Eötvös-ösztöndíjasként a paramágnesesen módosított fluoroforok vizsgálatával. Köszönetet mondok Dr. Jekő Józsefnek a tömegspektrometriai, Dr. Ósz Erzsébetnek és Dr. Berente Zoltánnak az NMR vizsgálatokért.

Köszönöm a hazai és külföldi együttműködő partnerek: Prof. Kosi Asada (Fukuyama Univ., Japan); Prof. Peter Bilski (NIH, Research Triangle Park, USA); Prof. Brücher Ernő (Debreceni Egyetem, Debrecen); Prof. Colin Chignell (NIH, Research Triangle Park, USA); Prof. Martin Engelhard (Max-Planck-Institute, Dortmund, Germany); Prof. Fogassy Elemér (BMGE, Budapest), Prof. Hideg Éva (MTA-SzBK, Szeged); Prof. Wayne L. Hubbell (UCLA, Los Angeles, USA); Prof. Ronald Kaback (UCLA, Los Angeles, USA); Prof. Periannan Kuppusamy (OSU, Columbus, USA); Prof. Gertz Likhtenshtein (Ben Gurion Univ., Beer Sheva, Israel); Prof. Govindasami Mugesh (Indian Institute of Science, Bangalore, India); Prof. Helmut Sies (Heinrich-Heine Univ., Düsseldorf, Germany); Prof. Heinz-Jürgen Steinhoff (Univ. of Osnabrück, Osnabrück, Germany); Prof. Sümegi Balázs (PTE ÁOK); Prof. Tóth Kálmán (PTE ÁOK); Prof. Wolfgang Trommer (Univ. of Kaiserslautern, Germany); Prof. John Voss (Univ. of California, Davis, USA); Prof. Jay L. Zweier (OSU, Columbus, USA) és kutatócsoportjaik munkáját, hogy az általunk előállított vegyületeket vizsgálták és közös közleményeinkkel nagyban hozzájárultak sok izgalmas eredmény születéséhez és az értekezésem elkészítéséhez.

Köszönöm Bognár Balázs, Fehér Andrea, Gadányi Szilvia, Kulcsár Győző, Müller Éva doktoranduszok és diákkörösök, Balog Mária, Bárász Nóra, Csokona Viola, Kis Krisztina, Lamperth Éva, Lazsányi Noémi, Lesnik Anita, Lovas Lászlóné, Rozsnyai Blanka vegyésztechnikusok, Dr. Deák Ivánné titkárnő, Klupp Gyuláné és Sajóvölgyi Gábor kisegítők munkáját, akikkel együtt dolgoztam ill. dolgozom. Köszönet illeti az intézet előző munkatársait Dr. Hankovszky Olgát, Dr. Lex Lászlót, Dr. Csekő Józsefet, Dr. Kulcsár Gyulát, Halász Aladárnét, Huszár Teréziát, Kneif Józsefnét és Ott Miklósnét, akik nagyban hozzájárultak a téma megalapozásához az 1970-es és 80-as években. Köszönöm a POTE és a



PTE ÁOK volt és jelenlegi vezetőinek, alkalmazottainak, hogy a kutatáshoz szükséges infrastruktúrát biztosították.

Hálával tartozom szüleimnek és azonak a barátaimnak, ismerőseimnek akik az elmúlt 14 évben támogattak és a napi gondoktól mentesítve lehetővé tették, hogy a kutatómunkámmal intenzíven foglalkozhassak. Bár a kutatómunkában nem vettek részt, mégis hadd álljon itt a nevük: Kálai Zoltán, Kálai Zoltánné, Erőss Józsefné, Julia Essert, Shirley Kerchner, Wushing Istvánné. Köszönöm továbbá a Magyar Tudományos Akadémiának a Bolyai-ösztöndíját, a kutatócsoportunknak nyújtott AKP, DFG, ETT, FKFP, OTKA támogatásokat.